



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

***“Efecto de ozonoterapia sobre las afecciones uterinas en vacas repetidoras”***

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista.

**Autor:**

Bryan Manuel Romero Aguilar

**CI:** 0705744472

**Director:**

Dr. Jhonny Alfredo Narváez Terán. Mg. Sc.

**CI:** 0102291218

**Cuenca – Ecuador**

**27-11-2019**



## Resumen

La investigación se realizó en las Granjas Nero” e “Irquis” de la Universidad de Cuenca y la hacienda particular “El Carmen” de la provincia del Azuay; el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la ozonoterapia sobre la endometritis subclínica en vacas repetidoras (VR), para este estudio se emplearon un total de 42 VR con endometritis subclínica (ES), multíparas con una condición corporal de 2.5 – 3; el diagnóstico de ES se realizó mediante citología endometrial considerando positivas aquellas que presenten un porcentaje  $\geq$  a 5 % de células polimorfonucleares (PMN), además se evaluó el diámetro de luz uterina en milímetros (mm) en la base de uno de los cuernos uterinos por ultrasonografía; posteriormente se procedió a recolectar muestras de secreción uterina para la identificación de agentes bacterianos; para luego realizar los tratamientos por vía intrauterina, para G1 (n = 21) se aplicó 500 mg de cefapirina benzatínica y para G2 (n = 21) se empleó 45 ug de O<sub>3</sub> en 50 ml de agua bidestilada estéril; luego de 72 horas se evaluó el efecto de los tratamientos. Los resultados se analizaron por estadígrafos básicos y tablas de contingencia, utilizando *INFOSTAT*. La prevalencia de ES en VR durante el estudio fue 47,76 %; en el G1 los PMN se disminuyeron de  $12,5 \pm 0,99$  a  $6,5 \pm 0,76$  % y para el G2 mostraron un efecto significativamente mayor de  $11,5 \pm 1,19$  a  $4,0 \pm 0,52$  %; el diámetro de la luz uterina se redujo en G1 de  $2,23 \pm 0,14$  a  $1,72 \pm 0,08$  y en G2 de  $2,21 \pm 0,12$  a  $1,62 \pm 0,13$  mm pero no difieren entre ellos; con relación a la presencia de agentes bacterianos el 45,24 % *Staphylococcus spp.*, 9,5 % *Escherichia Coli*, 7,4 % *Pseudomonas Spp.*, 9,5 % *Bacillus spp.*, y un 38 % de las muestras no presentaron aislamiento bacteriano; ambos tratamientos recuperaron la fertilidad, 33,0 % en G1 y 48,0 % para el G2 aunque no difieren ( $P > 0,05$ ). En conclusión, la administración intrauterina de cefapirina benzatínica y ozono reduce el diámetro de la luz uterina; sin embargo, el ozono resulto ser mejor en la reducción PMN que el tratamiento alopático (cefapirina benzatínica).

## Palabras Claves:

Ozono. Vaca repetidora. Endometritis subclínica. Diámetro uterino. PMN

**Abstract**

The research was carried out at “Nero” and “Irquis” farms of the University of Cuenca and the private farm “El Carmen” in the Azuay province; the objective of the study was to evaluate the effect of ozone therapy on subclinical endometritis in repeat breeder cows (RBC), for this study a total of 42 RBC with subclinical endometritis (SE), multiparous with a body condition of 2.5 - 3; the diagnosis of SE was made by endometrial cytology considering positive those that present a percentage  $\geq 5\%$  of polymorphonuclear cells (PMN), in addition the diameter of uterine lumen in millimeters (mm) at the base of one of the uterine horns was evaluated by ultrasonography; subsequently, samples of uterine secretion were collected for the identification of bacterial agents; to then perform the intrauterine treatments, for G1 (n = 21) 500 mg of cephapirin benzathine was applied and G2 (n = 21) 45 ug of O<sub>3</sub> was used in 50 ml of sterile bidistilled water; after 72 hours the effect of treatments was evaluated. The results were analyzed by basic statisticians, logistic regression and contingency tables, using INFOSTAT. The prevalence of SE in RBC during the study was 47.76%; in the G1 the PMNs decreased from  $12.5 \pm 0.99$  to  $6.5 \pm 0.76\%$  and for the G2 they showed a greater therapeutic effect  $11.5 \pm 1.19$  to  $4.0 \pm 0.52\%$ ; the diameter of the uterine lumen was reduced in G1 from  $2.23 \pm 0.14$  to  $1.72 \pm 0.08$  and in G2 from  $2.21 \pm 0.12$  to  $1.62 \pm 0.13$  mm not differ between them; in relation to the presence of bacterial agents, 45.24% Staphylococcus spp., 9.5% Escherichia Coli, 7.4% Pseudomonas Spp., 9.5% Bacillus spp., and 38% of the samples did not show isolation bacterial; the percentage of pregnancy reached was 33.0% in G1 and 48.0% for G2 they did not express differences ( $P > 0.05$ ) but manages to recover fertility. In conclusion, intrauterine administration of benzathine cefapirin and ozone reduces the diameter of the uterine lumen; however, ozone proved to be better in PMN reduction than allopathic treatment (benzathine cefapirin).

**Keywords:**

Ozone. Repeat breeder cows. Subclinical endometritis. Uterine diameter. PMN.



## Índice de Contenido

Resumen .....	2
Abstract .....	3
Índice de Contenido .....	4
Índice de Figuras.....	6
Índice de Anexos.....	7
Agradecimiento .....	10
Dedicatoria .....	11
Abreviaturas y simbología .....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1. OBJETIVOS.....	15
1.1.1. Objetivo General .....	15
1.1.2. Objetivos específicos.....	15
1.2. Hipótesis .....	15
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
2.1. Fisiológico del puerperio. ....	16
2.1.1. Modificaciones que suceden durante el puerperio.....	17
2.2. Síndrome de la vaca repetidora .....	22
2.2.1. Definición .....	22
2.2.2. Etiología da síndrome da vaca repetidora .....	23
2.2.3. Factores Extrínsecos .....	24
2.3. Clasificación de las enfermedades uterinas .....	26
2.3.1. La endometritis subclínica.....	27
2.4. Tratamiento síndrome de la vaca repetidora.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
3.1. Materiales.....	34
3.2. Métodos .....	35
3.2.1. Área de estudio .....	35
3.3. Metodología de las unidades experimentales .....	35
3.3.1. Selección de los animales.....	36



3.3.2.	Muestreo citológico por Técnica Cytobrush.....	36
3.3.3.	Evaluación citológica .....	36
3.3.4.	Evaluación del diámetro de luz uterina .....	37
3.3.5.	Toma de muestras para cultivo bacteriológico y aislamiento de agentes bacterianos .....	37
3.3.6.	Aplicación de los tratamientos. ....	38
3.3.7.	Evaluación de efecto de tratamientos.....	38
3.3.8.	Protocolo de sincronización de celo .....	39
3.3.9.	Diseño experimental.....	39
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
4.1.	Prevalencia de endometritis subclínica en vacas repetidoras. ....	40
4.2.	Efecto del tratamiento sobre el porcentaje de PMNs. ....	41
4.3.	Efecto del tratamiento sobre el Diámetro de luz uterina.....	42
4.4.	Relación del diámetro de luz uterina post-tratamiento sobre la fertilidad. 43	
4.5.	Relación de los PMNs post-tratamiento entre la fertilidad.....	44
4.6.	Aislamientos bacterianos de vacas repetidoras con endometritis subclínica.....	45
4.7.	Efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de preñez.....	46
5.	CONCLUSIONES .....	48
6.	RECOMENDACIONES .....	49
7.	BIBLIOGRAFIA .....	50
8.	ANEXOS .....	60



## Índice de Figuras

Figura 1 Involución uterina en vacas postparto .....	17
Figura 2 Citología endometrial .....	29
Figura 3 Porcentaje de diferencia del efecto de los tratamientos .....	42
Figura 4 Porcentaje de Preñez en relación a los PMNs Post-Tratamiento.....	44

## Índice de tablas

Tabla 1 Desempeño reproductivo de vacas en lactancia sin problemas reproductivos y desempeño reproductivo de vacas repetidoras.....	23
Tabla 2 Análisis descriptivo de los grupos seleccionados.....	40
Tabla 3 Diagnostico de endometritis subclínica en vacas repetidoras .....	40
Tabla 4 Efecto del tratamiento sobre el porcentaje de PMNs.....	41
Tabla 5 Efecto del tratamiento sobre el diámetro de luz uterina.....	43
Tabla 6 Relación del diámetro de luz uterina post-tratamiento sobre la fertilidad .	43
Tabla 7 Aislamientos Bacterianos .....	45
Tabla 8 Porcentaje de preñez .....	46



## Índice de Anexos

Anexo 1 Ubicación de la Granja Nero .....	60
Anexo 2 Ubicación de la Granja Irquis .....	60
.Anexo 3 Ubicación de la Hacienda El Carmen.....	60
Anexo 4 Equipo para Citología endometrial .....	61
Anexo 5 Técnica de Cytobrush .....	61
Anexo 6 Toma de muestra Citología y Cultivo Bacteriano .....	62
Anexo 7 Equipo Ozonificador .....	63
Anexo 8 Tinción de Giemsa .....	63
Anexo 9 Valoración Citológica.....	64
Anexo 10 Medición del diámetro de luz uterina mediante Ultrasonografía.....	64
Anexo 11 Preparación medios de cultivos.....	66
Anexo 12 Tinción de Gram.....	66
Anexo 13 Staphylococcus spp. en Agar Sal Manitol .....	67
Anexo 14 Echerichia Coli .....	67
Anexo 15 Bacillus spp .....	68
Anexo 16 Pseudomonas Spp. ....	68
Anexo 17 Promedio de la Variable PMNs a 72 horas pos tratamiento.....	69
Anexo 18 Promedio de la Variable Diámetro de luz uterina Pos Tratamiento .....	69
Anexo 19 Promedio de la Variable Preñez.....	69
Anexo 20 Relación del Diámetro luz uterina final entre preñez .....	70
Anexo 21 Efecto de los tratamientos sobre los PMNs finales .....	70
Anexo 22 Modelo de la hoja de campo .....	71





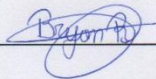
### Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

**Bryan Manuel Romero Aguilar** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Efecto de ozonoterapia sobre las afecciones uterinas en vacas repetidoras**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 27 de noviembre de 2019



---

**Bryan Manuel Romero Aguilar**

**C.I: 0705744472**





### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

**Bryan Manuel Romero Aguilar** autor del trabajo de titulación "**Efecto de ozonoterapia sobre las afecciones uterinas en vacas repetidoras**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 27 de Noviembre del 2019.

---

**Bryan Manuel Romero Aguilar**

**C.I: 0705744472**



## **Agradecimiento**

Agradezco a Dios por brindarme la fortaleza y capacidad para cumplir mis objetivos planteados en este largo camino.

A mis padres Víctor y Piedad por el incondicional apoyo durante mi carrera universitaria; a mis hermanos Ángel Santiago y Víctor Adrián acompañarme y ayudarme en los momentos difíciles.

Al doctor Jhonny Narváez M.V.Z Mg Sc, por su colaboración para realizar el presente trabajo investigativo y compartir sus amplios conocimientos, así también a los M.V.Z. Carlos Ortuño y Hugo Maldonado por apoyarme en todo momento.

Finalmente, un agradecimiento fraterno a todos mis amigos por su apoyo incondicional este logro no hubiera sido posible, gracias a todos.

**Bryan Manuel Romero Aguilar**



## **Dedicatoria**

A mis padres por brindarme todo su apoyo incondicional en todos estos años, gracias por su paciencia y comprensión; a mis hermanos que son alegría para mí y por ser ese impulso fundamental para mis metas.

A mi familia, por estar siempre pendientes en mis logros, a pesar de la distancia.

A todas las personas que han realizado un esfuerzo para que se realice con éxito esta tesis, especialmente aquellos que abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

**Bryan Manuel Romero Aguilar**



## **Abreviaturas y simbología**

**DA:** Días Abiertos

**DPP:** Días Postparto

**EMB:** Eosina azul de metileno

**ES:** Endometritis Subclínica

**GnRH:** Hormona estimuladora de las gonadotrofinas

**G1:** Cefapirina benzatínica en suspensión

**G2:** Agua destilada tipo II ozonificada

**IA:** Inseminación Artificial

**PMN:** Polimorfo mononucleares

**O<sub>3</sub>:** Ozono

**Mm:** Milímetros

**µg:** Microgramos

**LH:** Hormona luteinizante

**TSI:** Agar-hierro-triple azúcar

**VR:** Vaca Repetidora



## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la selección genética en la producción lechera, particularmente en vacas Holstein – Friesen ha aumentado significativamente, alcanzando producción de leche superiores a 10000 kg/vaca/año (1); sin embargo durante este mismo periodo el índice de concepción ha disminuido del 56% al 30 - 40% al primer servicio (2) y se afirma que las tendencias fenotípicas y genotípicas muestran una declinación anualmente sobre este índice es de 0.5% en los Estados Unidos, mientras que en Reino Unido es del 1 % anual (3); lo cual tiene un impacto negativo en la eficiencia reproductiva y rentabilidad de los hatos ganaderos (4).

En el manejo reproductivo de la vaca lechera alta productividad puede presentarse diversas patologías que disminuyen la fertilidad después parto, entre estas tenemos, el síndrome de vaca repetidora (SVR), se caracteriza por ser un grupo de vacas subfértiles clínicamente sanas y presentar ciclo estrales regulares, sin anomalías anatómicas o enfermedades infectocontagiosas (5). A la vaca repetidora (VR) se la define a aquella que no ha sido capaz de ser preñada luego de tres servicios consecutivos, a pesar de no tener signos clínicos detectables (6). La incidencia de la VR en los hatos ganaderos puede variar entre un 9 % hasta un 24% dependiendo de la región, el medio ambiente y manejo (6,7). Las causas de repetición de celos es multifactorial por ejemplo: involución uterina inadecuada, falta de detección de celo, calidad de semen, deficiencia de minerales, técnica de inseminación, infecciones uterinas, desordenes endocrinos, enfermedades infectocontagiosas (8,9). Sin embargo, las causas específicas SVR no están del todo determinadas.

Como se menciona anteriormente, un ambiente uterino anormal puede causar muerte embrionaria y la repetición de celos, la endometritis es la causa más importante de la disminución de la fertilidad (10); la prevalencia de endometritis subclínica (ES) en SVR en los hatos ganaderos varían entre 24 % a 54 %. La diferencia de estos resultados depende del punto de corte utilizados ( $\geq 3$  o 5% de PMN) (11).



En la actualidad se han propuesto diversos tratamientos intrauterinos enfocados al mejoramiento del entorno endometrial para la supervivencia del embrión, además se han desarrollado nuevas alternativas para el control de los procesos infecciosos endometriales; como es la ozonoterapia por sus propiedades antimicrobianas, antivirales, anti fúngica y antiprotozoaricas, que favorece la liberación de citoquinas y quimosinas para producir una repuesta inmune (12); además el ozono es una sustancia inocua para el medio ambiente, no produce residuos en leche (13) evitando la utilización de antibióticos. Con estos antecedentes nos hemos planteamos los siguientes objetivos.



## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto de la ozonoterapia sobre las afecciones uterinas que modifican la salud uterina en vacas repetidoras.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Diagnosticar endometritis subclínica en vacas repetidoras, mediante la técnica de *cytobrush* (% de las células PMN).
- Evaluar mediante ultrasonografía el efecto el diámetro de luz uterina sobre la fertilidad de vacas repetidoras.
- Identificar agentes bacterianos uterinos en las vacas repetidoras.
- Comparar el efecto de la ozonoterapia vs un tratamiento alopático en vacas repetidoras.

## 1.2. Hipótesis

El tratamiento con ozono es más eficaz que un tratamiento alopático sobre la endometritis subclínica en vacas repetidoras.





## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Fisiológico del puerperio.

El puerperio es el periodo que inicia inmediatamente luego del parto, hasta el restablecimiento del aparato a su estado pregravido. Este periodo es importante en la vida reproductividad del ganado lechero debido a su influencia en la fertilidad futura y la rentabilidad de las explotaciones (14).

El puerperio es un proceso fisiológico de modificaciones anatómicas, histológicas, bacteriológicas, citológicas, metabólicas que sufre el útero, es el tiempo entre la expulsión de la placenta y la involución uterina. Este periodo finaliza con la reactivación ovárica postparto (15). De esta manera, un alargamiento del puerperio puede tener grandes efectos negativos en la productividad del animal (parto/año/cría) (16). En el desarrollo fisiológico del puerperio se distinguen tres fases:

- **Puerperio Temprano:** También conocido como puerperio precoz se extiende hasta el día 14 postparto. El tracto reproductivo, especialmente el útero empieza a disminuir el tamaño original incluyendo los ligamentos sacros ciáticos y la arteria uterina (17).
- **Puerperio Intermedio:** Se prolonga desde el 15 hasta el 21 día post parto, es donde la hipófisis llega a ser sensible a la GnRH, hasta la primera ovulación. Este período existen factores que afectan la reactividad ovárica (ovulación y ciclicidad), después del parto como edad, manejo, raza, nutrición, estación del año, enfermedades metabólicas y la presencia del toro (17).
- **Puerperio tardío o Total:** Se extiende desde la primera ovulación hasta la involución uterina completa, aproximadamente 42-45 días post parto, aunque este periodo puede llegar hasta los 52 a 56 días. Además la contaminación bacteriana del útero desaparece por completo (15,17).

### 2.1.1. Modificaciones que suceden durante el puerperio.

Durante el puerperio ocurren varias modificaciones uterinas, entre las más importantes tenemos.

#### 2.1.1.1. Involución uterina

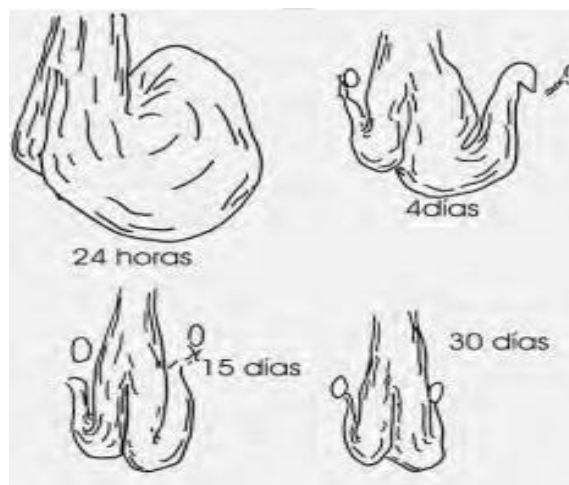
El útero después del parto sufre cambios macroscópicos y microscópicos, hasta alcanzar las características de un útero normal, es decir el útero regresa a condiciones similares como fue antes del parto. La involución uterina es un proceso de recuperación del útero de su estado gestacional y los efectos del parto, a un estado pre gestacional, se puede definir como un regreso a la normalidad en cuando a su tamaño uterino, a su tonicidad, consistencia y ubicación (15).

El proceso de involución uterina se lleva a cabo mediante contracciones postpartales que son responsables de la disminución de la luz uterina y del volumen uterino. Las contracciones uterinas facilitan la eliminación de fluidos placentarios.

La reducción del tamaño uterino dependerá de varios factores entre ellos:

- Las contracciones uterinas y la reducción del tamaño de las células endometriales.
- La vasoconstricción y la disminución del aporte sanguíneo al útero.
- Eliminación de los loquios y la reabsorción del edema tisular (18).

**Figura 1** Involución uterina en vacas postparto



**Fuente:** (19)



La involución uterina es proceso aséptico en la cual mayor del 90 % de las hembras, sufren una contaminación del aparato reproductivo después del parto, debido a la presencia microorganismos en el ambiente y sus órganos genitales externos. A pesar de esta situación, la incidencia de enfermedades uterinas dependerá del grado de contaminación en la cavidad uterino (20).

A los 20 días después del parto, el tamaño del útero debería estar reducido en más de un 80 %. Este proceso en condiciones normales concluye entre los 38 a 45 días post parto. Cualquier enfermedad uterina o metabólica después del parto retrasara la involución uterina y la actividad ovárica postparto. Al mismo tiempo que el útero reduce de volumen, el endometrio sufre un proceso regenerativo para estar en condiciones de albergar un nueva gestación.

La involución uterina en vacas multíparas es más demorada debido a alteraciones en el postparto (distocia, metritis y retención placentaria), partos gemelares, partos en épocas invernales (21).

#### **2.1.1.2. Contaminación Uterina**

Antes del parto, el útero se mantiene un ambiente uterino estéril. Durante y después del parto, la vulva esta relajada, el cérvix esta dilatado permitiendo el ingreso de microorganismo patógenos y no patógenos que se encuentran en el medio ambiente. Primero ingresan en el interior de la vagina, posteriormente se distribuyen en el lumen uterino (22,23). Es una infección espontanea caracterizada por el proliferación bacteriana que se ve favorecida por la presencia de los loquios (24), esta contaminación uterina se presenta alrededor de un 95 % de las vacas durante las dos primeras semanas de postparto y se reduce hasta el día 60 postparto (2,23).

Según Sheldon (2004) estableció una relación entre los días post parto (DPP) y el grado de colonización bacteriana, en donde el 78% de úteros son colonizados entre los 16 – 30 DPP, el 50% entre los 31 – 45 DPP y solo el 9% de los úteros son colonizados entre los 46 – 60 DPP (23).

#### **2.1.1.3. Flora Bacteriana**

El aparato reproductivo de la hembra bovina posee flora bacteriana en casi toda su distensión, a excepción del útero, por lo general el útero es un ambiente casi estéril,



si se produce una invasión microorganismo generalmente existe disminuye la fertilidad (25). Además, puede produce reabsorción del feto o aborto. Durante el parto, las barreras físicas del tracto genital se ven comprometidas, lo cual facilita el ingreso de bacterias oportunistas a la luz uterina (26).

Las bacterias aisladas del tracto reproductivo se las pueden clasificar según su grado de patogenicidad: patógenos asociados con lesiones endometriales uterinas, patógenos no comúnmente asociados con lesiones uterinas y patógenos oportunistas aislados transitoriamente de la luz uterina y no asociados con endometritis (27). Los agentes bacterianos más frecuente asilados del útero bovino son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Lactobacillus spp*, *Pseudomonas spp*, *Proteus spp*, *Bacillus spp* y *Arcanobacterium pyogenes* (28).

#### **a. *Escherichia coli*:**

*Escherichia coli* es una de las especies bacterianas más estudiadas en la actualidad. Es un bacilo no esporulado Gram negativo habitante saprofitos del tracto intestinal de los mamíferos. Esta bacteria generalmente se encuentra en el moco secretado por las células epiteliales del colon (29).

Cuando se produce una colonización de *E. coli* a nivel del útero y junto con las endotoxinas facilitan una infección posterior con *A. pyogenes* (30). Lo cual, se desarrolla un proceso infeccioso, además inhibe el crecimiento folículo dominante postparto y la secreción de estradiol (31). Se ha demostrado que la fagocitosis de los polimorfo mononucleares es inhibida por la presencia de *E. coli* (30).

La virulencia de *E. coli* varía de acuerdo de las cepas presentasen en los úteros. Por ejemplo cuando existe la presencia del gen FimH de *E. coli* se asocia con mayor riesgo de metritis y endometritis clínica se lo puede encontrar unos días después del parto. En estudios recientes se reportó aislamiento de cepa de *E. coli* en un 29% de vacas que presentaron problemas en el aparato reproductivo (32).



### **b. *Staphylococcus spp.***

Los estafilococos son habitantes de la microbiota de la piel y mucosas del tracto respiratorio, urogenital, digestivo de los animales y ser Humano. Su presencia en floras endógenas proporciona la oportunidad de causar infecciones. La palabra *Staphylococcus* deriva de los términos griegos **Staphylo**: racimo de las células y **coccus**: indica que tiene una forma de esfera. Las principales especies patógenas para los animales son *S. aureus*, el *S. saprophyticus* y el *S. epidermidis*. Estas bacterias pueden causar daño en diferentes órganos del cuerpo si no se dan el tratamiento necesario para combatir (33).

Los estafilococos crece fácilmente casi en todos medios bacteriológicos, en cultivos agar sangre y en agar sal manitol medio selectivo se incuban a 37 °C durante 24 a 48 horas. Los criterios de identificación para su aislamiento son: Características de colonias y producción de catalasa (33).

En estudios recientes sobre aislamiento de bacterianas uterinas encontraron una incidencia de un 13 a 47 % de *Staphylococcus spp* (27,34).

### **c. *Bacillus spp***

Son bacilo grande Gram positivo productores de esporas. Las especies de *Bacillus* crecen en medios no enriquecidos son positivos a prueba de catalasa, aeróbicos y en los medios de cultivos se visualizan las bacterias en pareja o en cadenas largas. Las mayorías de las especies son saprofitos, sin potencial patógeno. El *Bacillus Licheniformes* está implicado en abortos esporádicos en ganado bovino y ovino (35).

### **d. *Pseudomonas spp***

Las *Pseudomonas* se encuentran integrado por numerosas especies distribuidas en el medio ambiente, en el suelo, agua, materia orgánica en descomposición, en piel, nasofaringe, el tubo digestivo del ser humano y animales. El género *pseudomonas* es un bacilo gramnegativo, móviles por flagelos polares, aeróbico. Características de cultivo crecen con facilidad en agar sangre y en medios nutritivos simples. El aislamiento y la identificación se realiza sembrando en muestras en medios de



cultivos agar sangre y medios nutritivos simples durante 24 a 48 horas a 35 C. las colonias son translúcidas, extensivas, con bordes ondulados semejantes a un huevo frito. Al colorear mediante la tinción de Gram se visualiza un bacilo gran negativo, cuya morfología no se diferencia de las enterobacterias (36).

Las principales infecciones producidas por pseudomonas en bovinos son mastitis, abortos infecciones de piel y artritis.

#### **2.1.1.4. Mecanismo de defensa del útero postparto**

El estado inmunológico de los bovinos y el mecanismo de defensa uterino juega un papel importante en la protección del útero contra la invasión de agentes bacterianos (37). El aparato reproductor de la hembra bovina esta proporcionado por estructuras anatómicas tales como la vulva, el vestíbulo vaginal y el cérvix contra la invasión bacteriana. Normalmente el útero posee su propio mecanismo de defensa eficaz para el control y eliminación de microorganismos presentes, mediante la involución del útero y cérvix, descarga del contenido uterino y la liberación de células fagocitarias (polimorfonucleares, monocitos y macrófagos tisulares) que migran hacia el útero para resolver la infección uterina (10). Los PMN son el principal mecanismo de defensa inmunológica en el útero (25).

Por lo tanto, la velocidad de respuesta de las células epiteliales y estromales en el endometrio para alertar a las células hematopoyéticas de la presencia de microorganismos patógenos en el útero determina el éxito contra el proceso infeccioso (38).

#### **2.1.1.5. Reinicio de la actividad ovárica postparto**

El reinicio de la actividad ovárica en razas de actitud cárnica es de 6 a 8 semanas postparto y en razas de actitud lechera es de 3 a 4 semanas postparto. La primera ovulación en el período postparto es esencial para la eficiencia reproductiva futura y su ausencia caracteriza por un anestro temporal (20,39).

El comportamiento reproductivo de las hembras es fundamental para disminuir el intervalo entre partos, para ello vaca debería ser preñada dentro de los primeros tres meses posteriores al parto para tener una cría cada año. Esto requiere reinicio



de actividad ovárica normal, que debería iniciar pocas semanas después del parto (40).

En vacas lecheras saludables el intervalo a la primera ovulación dura de 21 a 30 días una ovulación temprana (<21 días) está relacionada directamente nutrición y condición corporal del animal (20). Las enfermedades uterinas puerperales pueden prologar el intervalo anovulatorio 50 a 60 días postparto disminuyendo la tasa de preñez por varios meses (41).

En vacas lecheras Holstein para el desarrollo de la primera onda folicular comienza 7 a 15 días postparto de las cuales aproximadamente un 40 a 50% de vacas logran su ovulación del folículo dominante de la primera onda entre los 20 – 30 días de lactancia; otro 30 a 40% de vacas logran ovular el folículo de las subsiguientes ondas entre 30 a 50 días y aproximadamente entre el 10 al 30% de vacas permanecen en un periodo anovulatorias superior a los 50 días postparto (42).

En ganado lechero bien alimentado puede presentar un celo a partir de los 30 días postparto. Además puede presentarse la primera ovulación a partir del 10 al 15 día postparto sin signos estrales, el 80% de las vacas pueden presentan una ovulación silente en el primer ciclo estral y un 50% en el segundo ciclo estral, esto significa que al palpar la vaca a los 30 días máximo, el 30% poseen un cuerpo lúteo activo, lo cual nos indica que han manifestado celo (43).

La reanudación de actividad cíclica del ovario es esencial en las vacas lecheras postparto para asegurar la siguiente preñez y la rentabilidad del hato.

## **2.2. Síndrome de la vaca repetidora**

### **2.2.1. Definición**

El síndrome de la vaca repetidora (SVR) es considerado después del anestro postparto. Es un problema reproductivo en la cría de ganado que conlleva grandes pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas, debido que afecta eficiencia reproductiva: aumentado los días abiertos, los servicios por concepción, tasa de descarte en los hatos ganaderos. Además disminuye la producción lechera y la disponibilidad de hembras de reposición (6). La vaca repetidora son animales





clínicamente sanos. A este síndrome se lo ha definido como la incapacidad de concebir a partir de 3 o más servicios consecutivos, en ausencia de anomalías detectables en el examen ginecológico (9,44). La incidencia de VR en los hatos ganaderos está entre 9 y 24 % dependiendo de las condiciones de manejo, región y el medio ambiente (6,7).

Un estudio realizado por Yusul *et al.*, (6) comparan desempeño reproductivo de vacas repetidoras con vacas en lactancia, demuestran las vacas con fertilidad normal requieren 1.7 servicios por concepción. Mientras tanto las vacas repetidoras requiere 4.7 servicios por concepción. Por lo tanto afecta la eficiencia reproductiva: mayor número días abiertos y aumenta de número de pajuelas empleadas por preñez.

**Tabla 1** Desempeño reproductivo de vacas en lactancia sin problemas reproductivos y desempeño reproductivo de vacas repetidoras.

	Vacas en lactancia	Vacas repetidoras
Vacas inseminadas	479	86
Servicios por concepción	1,7 $\pm$ 0,1	4,7 $\pm$ 0,2
Intervalo parto concepción (días)	114 $\pm$ 3	211 $\pm$ 10
Porcentaje de preñez $\leq$ 150 dpp (%)	75,2	11,6
Porcentaje de preñez $\leq$ 300 dpp (%)	99,8	50

**Fuente:** (45)

### 2.2.2. Etiología da síndrome da vaca repetidora

El SVR se debe al fracaso fertilización o muerte embrionario antes del día 15 del ciclo estral (antes o en el momento del reconocimiento materno-fetal) (46).

Las causas del síndrome de vaca repetidora son consideradas de origen multifactoriales involucrando factores intrínsecos como también extrínsecos de la hembra bovina. Los factores extrínsecos del animal se consideran los desbalances nutricionales y problemas de manejo. Entre los factores intrínsecos tenemos infección uterina, desbalances hormonales y factores genéticos (defecto anatómico



del tracto reproductivo). Además que una alta capacidad de producción de leche también tiene un fuerte impacto en la fertilidad de las vacas lecheras (6,47).

### **2.2.3. Factores Extrínsecos**

#### **a. Desbalance nutricional**

Se caracteriza por una ingesta insuficiente de nutrientes, los cuales son destinados únicamente hacia las funciones vitales prioritarias, tales como la lactación, dejando en un segundo plano la actividad reproductiva( reinicio de la actividad ovárica) (48,49).

Después del parto, los animales atraviesan un período de balance energético negativo, en el cual se produce cambios metabólicos, endocrinos y fisiológicos. Se considera que el balance energético sería el principal factor regulador del retorno a la actividad ovárica (49,50).

El BEN limita la capacidad de respuesta del ovario a la estimulación de gonadotropinas, interrumpiendo el ciclo ovulatorio normal; debido a una disminución de la frecuencia de picos de LH, disminución de la progesterona en plasma y una actividad ovárica limitada (51). Se asume que esta disminución en LH, es consecuencia directa de baja secreción de la hormona estimuladora de las gonadotrofinas (GnRH) a nivel hipotalámico. Otro sitio de acción es el ovario, donde una nutrición deficiente afecta a la disponibilidad de colesterol como precursor de las hormonas esteroidales (49).

Otro factor que afecta el proceso reproductivo debido al BEN es la reducción en la concentración de progesterona en el posparto temprano, siendo esta hormona necesaria en ese momento para la regulación de los cambios en el ambiente uterino haciéndolo propicio para el crecimiento y desarrollo del embrión (51).

#### **b. Problemas de manejo**

El manejo de las vacas lecheras de alta producción es un gran desafío en cualquier sistema de explotación (semi-intensivo o intensivo), independientemente del tipo de alimentación o instalaciones disponibles. Para lograr que una se preñe en menor tiempo posible, hay que brindarle las condiciones óptimas para que sea así. El



manejo nutricional es la clave. Un manejo nutricional deficiente conlleva producir perdidas de condición corporal, lo cual conduce a producir muertes embrionarias tempranas (2).

Además, una inadecuada técnica de detección del celo, conlleva inseminar vacas que no están en celo o en la etapa inadecuada para realizar la inseminación, otros factores a considerar es calidad de semen y la técnica de inseminación (6).

#### **2.2.4. Factores Intrínsecos**

##### **2.2.4.1. Desbalances Hormonales.**

La fertilidad de las vacas lecheras continúa disminuyendo año tras año. Se han sugerido varias razones para esto, entre ellas tenemos los desbalances hormonales. Para comprender la influencia de las causas endocrinas entender la fisiología reproductiva e interacción de las hormonas de la reproducción que afectan la vida útil del cuerpo lúteo (52).

La presencia del embrión dentro del útero durante los días 14 a 18 es suficiente para mantener la fase luteal y la gestación. El alargamiento de la fase luteal es producido por liberación de concentraciones adecuadas de interferón Tau que impide la liberación de prostaglandinas F2a desde el útero, la cual favorece a la luteolisis. La luteolisis se ha considerado la principal causa de mortalidad embrionaria en las vacas (2).

El ambiente uterino juega un papel importante en la determinación de la calidad de embrión con la concentración de progesterona. La presencia de bacterias patógenas afectan las posibilidades de desarrollo y supervivencia del embrión. Una baja concentración de P4 post IA, disminuye el crecimiento embrionario, y por lo tanto este tiene menor capacidad de producir interferón-tau, lo que afecta el reconocimiento materno de gestación (2).

El ambiente uterino juega un papel importante en la determinación de la calidad de embrión con la concentración de progesterona. La presencia de bacterias patógenas afectan las posibilidades de desarrollo y supervivencia del embrión (53).



Por lo tanto, una disminución de la duración del celo o celos silenciosos, pueden llevar mala observación del celo y una técnica de inseminación inadecuada. En un trabajo realizado en VR se observó que un 50% de VR presentaban celos silenciosos. Las disfunciones ováricas son difíciles de diagnosticar. Se requiere realizar perfiles hormonales de las hormonas esteroides ováricas (0,8-1,5 ng/ml progesterona y 2 – 3 mg/ml Estradiol) (53).

#### **2.2.4.2. Infecciones Uterinas**

Las infecciones uterinas en el ganado lechero son responsables de importantes pérdidas económicas debido a la disminución de la preñez por inseminación, extensión de intervalos parto-concepción e incremento de la tasa de descarte. El ambiente uterino se ve afectado por la contaminación de agentes bacterianos patógenos después del parto. Frecuentemente las bacterias patógenas persisten causando enfermedad uterina, causa clave de infertilidad (23). De tal motivo, cualquier alteración en la salud uterina puede inducir el síndrome de la vaca repetidora.

Las infecciones uterinas son las responsables en retrasar la involución uterina y el cérvix, alterando el desarrollo de la fase folicular y aumenta las muertes embrionarias y tasa de retorno de celo (10).

### **2.3. Clasificación de las enfermedades uterinas**

Las enfermedades uterinas tienen una variedad de definiciones en los diferentes trabajos de investigación, lo cual dificulta su análisis y comparación entre estudios, pero actualmente se ha puesto un consenso para facilitar el entendimiento de cada patología (54).

- a. Metritis puerperal.** Ocurre durante las dos primeras semanas después del parto y se caracteriza por presentar signos sistémicos (disminución de producción de leche y fiebre).
- b. Metritis clínica** se la puede definir que se presenta hasta los 21 días postparto, sin signos sistémicos, pero presentan aumento de dimensiones del útero y descargas purulentas o mucopurulenta.



- c. **Endometritis clínica** se la define como la inflamación del endometrio después de 21 días posparto y se presenta cuando se identifica la descarga vaginal purulenta o mucopurulenta.
- d. **Endometritis subclínica** se define como la presencia de inflamación crónica del endometrio a partir de los 21 DPP y sin la presencia de signos clínicos.

### 2.3.1. La endometritis subclínica

La endometritis subclínica se define como una inflamación endometrial crónica, que ocurre en cualquier momento posterior a la recuperación histológica de la involución uterina (55); y se caracteriza por una infiltración extensiva de neutrófilos, que puede ser detectada mediante un examen citológico del endometrio (56). A pesar de no presentar signos clínicos existe mínimas cantidades de exudado dentro del útero (57).

La gravedad de endometritis subclínica es suficiente para afectar el rendimiento reproductivo de las vacas lecheras (28). Un estudio afirma que los animales clínicamente sanos que fueron sometidos a tratamientos tuvieron un mejor desempeño reproductivo que los que no recibieron ningún tratamiento, lo que sugiere, que vacas identificadas clínicamente sanas a examen ginecológicos deberían ser evaluadas para la endometritis subclínica (23).

Según Barański *et al.*, (58) demostró que la endometritis subclínica tiene mayor relación con el proceso de la involución uterina y la facilidad de recuperación del endometrio en el postparto y es la principal causa del síndrome de la vaca repetidora.

#### 2.3.1.1. Patogenia

Las bacterias colonizan el útero después del parto y son reconocidas por el sistema inmunológico del animal, lo cual resulta en la llamada de células de la inflamación, como los neutrófilos, los PMN son movilizados al lumen uterino e inician un proceso de eliminación de los agentes patógenos. La cantidad de células inflamatorias frente a las células endometriales se convierte en un indicador del proceso de inflamación y es una característica importante de la endometritis subclínica (59).



La endometritis subclínica se puede ser diagnosticada citológicamente considerando un valor  $>18\%$  de células polimorfonucleares (PMN) en las muestras de citología endometrial colectadas entre los 21 y 33 días post-parto,  $>10\%$  de células PMNs en muestras colectadas entre los 34 y 47 días postparto y un valor  $>5\%$  de células PMNs en muestras colectadas después de los 60 días postparto (56).

La prevalencia de endometritis subclínica en SVR en los hatos ganaderos varía entre 24 % a 54 %. La diferencia de estos resultados depende del punto de corte utilizados ( $\geq 3$  o 5% de PMN) (11,60).

#### **2.3.1.2. Factores de riesgo**

Es importante conocer cuáles son los factores de riesgo, ya que darán lugar a un desequilibrio entre las defensas del organismo y los agentes microbianos. Los factores de riesgo para el desarrollo de endometritis subclínica en vacas repetidoras, según (11):

- Partos distócicos y gemelares
- Maniobras obstétricas
- Retención placentaria
- Baja condición corporal
- Hipocalcemia e hipoglucemia.
- Falta de higiene de las instalaciones o durante el parto

#### **2.3.1.3. Técnicas de diagnóstico endometritis subclínica**

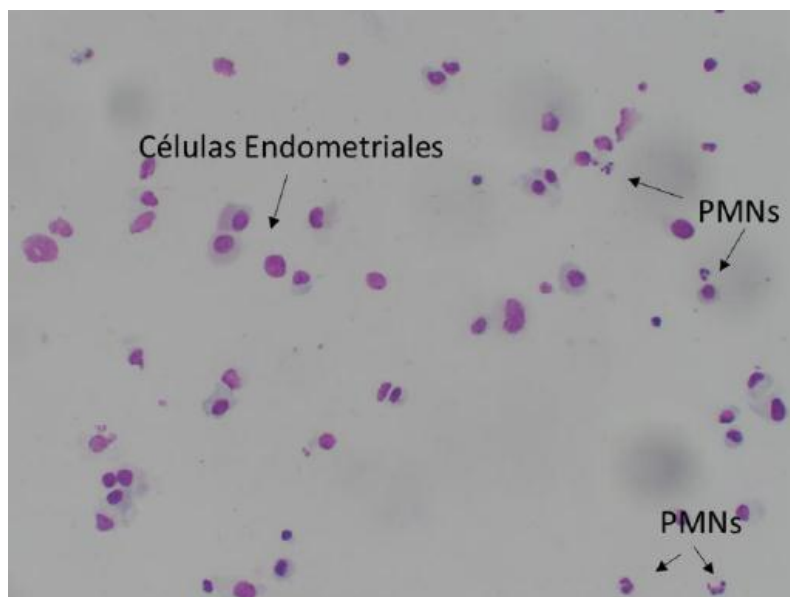
Se pueden utilizar distintas técnicas para el diagnóstico de endometritis. Entre ellas tenemos la ultrasonografía que nos permite evaluar cambios fisiológicos y patológicos del tracto reproductivo y para seguir las interacciones de la dinámica folicular. También nos ayuda como diagnóstico diferencial de ciertas patologías como tales quistes ováricos, endometritis, piometra, momificación fetal, abscesos y tumores. Además ayuda evaluar el incremento de líquido en el lumen uterino, incremento en el diámetro cervical y de los cuernos uterinos, cambios en la eco textura, que pueden ser factores asociados con el SVR (61,62).

El ultrasonografía es una técnica fácil de implementar en las ganaderías y con el tiempo, la tecnología mejorara estos dispositivos. Sin embargo, el ultrasonografía tiene una sensibilidad del 88 % y una especificidad del 62 % para el diagnóstico de ES (63).

### **Citología endometrial**

A citología endometrial ha sido utilizada para evaluar procesos infecciosos (vaginitis, cervicitis, endometritis en los animales domésticos. Por lo general, los trastornos inflamatorios uterinos comienzan con la contaminación de agentes bacterianos patógenos en el lumen uterino, los cuales se adhiere a la mucosa uterina, colonizan o penetran el epitelio y liberan endotoxinas. Células inflamatorias y endometriales pueden ser colectadas mediante biopsias uterinas, lavado uterino y la técnica de Cytobrush son técnicas idóneas para evaluar la citología endometrial (65). Técnica de Cytobrush ha sido determinada como superior a otros métodos para la colección de células cervicales y endometriales (61).

### **Figura 2 Citología endometrial**



Fuente: (66)





## Cultivo bacteriológico

La contaminación bacteriana uterina después del parto, es evidente en la mayoría de las vacas lecheras y principal causa de infertilidad. En muchos países han implementado los cultivos bacteriológicos para restringir el uso indiscriminado de los antibióticos y evitar la resistencia bacteriana. Los principales agentes patógenos se encuentran *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Proteus spp* entre otras (23). La muestra para el cultivo se puede obtener mediante la técnica de Cytobrush (67).

### 2.4. Tratamiento síndrome de la vaca repetidora

Los diferentes tipos de tratamientos se han enfocado en reducir el impacto negativo en las granjas por este síndrome VR. El tratamiento nutricional consiste la suplementación de nutrientes esencial, para mejorar la eficiencia reproductiva. La carencia de minerales (fosforo y zinc), esta relacionados directamente con los niveles bajos de progesterona. Los cuales pueden causar infertilidad y muerte embrionaria tempranas (44).

Los tratamientos hormonales consiste la implementación de hormonas exógenas tales: la progesterona es requerida para supervivencia del embrión y evitar muertes embrionarias tempranas. La GnRH el objetivo el acelerar y garantizar la ovulación, estimulando la secreción y liberación de las gonadotropinas (FSH y LH). Las gonadotropinas exógenas permiten inducir la ovulación o ejerce un efecto luteotrofico en cuerpo lúteo. El objetivo de estas hormonas es aumentar probabilidad de preñez en la vaca repetidora (44).

Los tratamientos intrauterinos son los más utilizados para contrarrestar los procesos infecciosos locales debido que son una de las causas principales de este síndrome. La administración de antimicrobianos pueden mejorar la eficiencia reproductiva después del parto (54,68). Una alternativa a estos tratamientos es la ozonoterapia por vía intrauterina favorece el proceso granulación, epitelización y activa el mecanismo de fagocitosis local (69).



## **2.4.1. Tratamiento con Ozono**

### **2.4.1.1. Generalidades**

El ozono existe sobre toda la superficie de la tierra es continuamente producido en la estratosfera mediante las radiaciones ultravioletas descompone las moléculas de oxígeno ( $O_2$ ) las cuales se unen con otros átomos de oxígeno formando el ozono ( $O_3$ ). El ozono es un gas inestable que no se puede ser almacenado, se disuelve en el agua, plasma o en los fluidos extracelulares (13).

### **2.4.1.2. Uso de la ozonoterapia**

Las terapias con ozono médico ha sido usadas desde principios del siglo pasado en los Estados Unidos. Los primeros estudios mencionan que era utilizado como complemento terapéutico para diferentes enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (70). Es una molécula capaz de inactivar bacterias, virus, hongos, levaduras, protozoarios. Tiene un efecto directo sobre la pared bacteriana, crecimiento del hongo y capsida viral. Además, estimula el metabolismo del oxígeno en los tejidos, activa el sistema inmune y actividad analgésica (71).

En medicina veterinaria como terapia alternativa para ciertos trastornos patológicos como mastitis, metritis, endometritis, retención de membranas fetales, vaginitis, urovagina, degeneración articulares y dermatitis (53,72).

### **2.4.1.3. Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción de la terapia de ozono se produce mediante la activación de los sistemas de protección antioxidante. El ozono tiene la capacidad de reaccionar inmediatamente con numerosas moléculas y iones presentes en los fluidos biológicos (solución salina fisiológica, plasma, linfa, orina, etc), principalmente los antioxidantes, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos (1).

El ozono daña la integridad de la pared celular bacteriana a través de la oxidación de fosfolípidos y lipoproteínas estructurales, en hongos inhibe el crecimiento celular en ciertas etapas, en virus deteriora la capsida viral e interrumpe su multiplicación; además que en células alteradas actúa oxidándolas, lo que facilita su eliminación y reemplazo por células sanas (73).



#### **2.4.1.4. Efecto bactericida del ozono**

El ozono es capaz de eliminar a bacterias Gram positivas y gramnegativas, incluyendo la pseudomonas aeruginosa y la Eschericea coli; ambas bacterias son tremendamente resistentes a los antibióticos. Los efectos desinfectantes locales, antiviral y antibacterianos del ozono se deben a su capacidad germicida, básicamente a su alta capacidad oxidante sobre las paredes bacterianas (74).

#### **2.4.1.5. Efecto antiinflamatorio y analgésico del ozono**

El ozono tiene un mecanismo dual antiinflamatorio y analgésico. Ejerce estos efectos actuando sobre diversos tejidos blancos: disminuyendo la producción de mediadores de la inflamación, la oxidación de algunos mediadores de la inflamación y mejorando la microcirculación sanguínea local, mejorando de esta manera la entrega de oxígeno a los tejidos lo cual estimula la regeneración de estructuras anatómicas, eliminación de toxinas y resolución del disturbio que generó el dolor (75).

El efecto antiinflamatorio del ozono se basa en su capacidad para oxidar compuestos que contienen enlaces dobles, entre ellos el ácido araquidónico y las prostaglandinas, sustancias biológicamente activas que se sintetizan a partir de la fosfolipasa que participan en grandes concentraciones en el desarrollo y en el mantenimiento del proceso inflamatorios. El mecanismo analgésico del ozono se basa en activar sustancias endógenas que incrementan la concentración de endorfinas endógenas (76).

#### **2.4.1.6. Efecto inmunomodulante**

El mecanismo de acción del ozono sobre el sistema inmunitario es directo sobre glóbulos blancos (linfocitos y monocitos), estimula la liberación de citoquinas, interferones, factor de necrosis tumoral, y las interleuquinas (12). El efecto del ozono es regular las reacciones inmunológicas producidas por patologías auto inmunitarias (70).



#### **2.4.1.7. Dosificación**

En medicina humana, se utilizan concentraciones de ozono-oxígeno entre 1 - 100 ug/ml. En medicina veterinaria, las concentraciones utilizadas van desde 6, 20, 30, 50 y 70 ug/ml (77).

#### **2.4.1.8. Ozonoterapia intrauterina en bovinos**

El ozono se emplea para el tratamiento de metritis puerperal, disuelto en solución salina, por vía intrauterina, demostrando que esta terapia alternativa es menor agresiva con los tejidos uterinos, favoreciendo su recuperación y reinicio de la actividad reproductiva más rápidamente que con los antibióticos. Además no afecta la viabilidad de los espermatozoides, no crea resistencia y no posee efectos residual en leche y carne (71,77).

El ozono es más eficaz en los tratamientos de metritis, endometritis, urovagina y retención placentaria en vacas lecheras, comparándolo con tratamientos hormonales o antibióticos, mejorando la fertilidad del ganado (78,79)



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

- **Materiales Biológicos**

- Vacas Holstein Mestizas

- **Materiales Químicos**

- Gas Ozono
- Reactivo de Giemsa
- Alcohol 70 %
- Cefapirina Benzatinica 500 mg en suspensión
- Hormonas(Implantes de Progesterona, Benzoato de estradiol, prostaglandinas, GnRH)
- Medios de Cultivos (Agar Sangre, Agar Manitol, EMB, Agar Tripe Azúcar Hierro).
- Agua destilada tipo II estéril
- Suero fisiológico: Cloruro de sodio 0.9%
- Yodo Povidine 5%
- Tinción de Gram

- **Materiales Físico**

- Registros Reproductivos de los hatos
- Microscopio óptico
- Equipo Ozonificado
- Gel lubricante
- Catéter de lavado
- Jeringas de 50 ml.
- Citocepillo
- Camisa sanitaria
- Cajas Petri
- Ecógrafo
- Cámara de cultivo



### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Área de estudio

Esta investigación se realizó en la “*Granja Nero*” y la “*Granja Irquis*” de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, perteneciente a la Universidad de Cuenca y la hacienda particular “El Carmen”. La “*Granja Nero*” se encuentra ubicada en la Provincia del Azuay, a 12 km de cantón Cuenca, Parroquia Baños, Sector Nero cuyas coordenadas son Latitud Sur: 2°57'24"S y Longitud Oeste 79°6'22"O; altitud de 3100 m.s.n.m.; pluviosidad anual entre 500 mm y 1000 mm, humedad relativa del 80% y una temperatura promedio de 10 °C. **Anexo 1** La “*Granja Irquis*” se encuentra ubicada en el km 20 de la vía Cuenca – Girón, a la altura de la parroquia Victoria del Portete cuyas coordenadas son Latitud Sur: 3°4'48"S y Longitud Oeste 79°4'31"O; altitud de 2660 m.s.n.m.; pluviosidad anual entre 770 mm y 1000 mm, humedad relativa del 80% y una temperatura promedio de 12 °C. **Anexo 2** La hacienda “*El Carmen*” se encuentra ubicada en la parroquia Tutupali Chico, Sector la Inmaculada cuyas coordenadas son Latitud Sur: 3°0'30"S y Longitud Oeste 79°6'12"O; altitud de 2900 m.s.n.m.; pluviosidad anual entre 800 mm y 1100 mm, humedad relativa del 80% y una temperatura promedio de 15 °C. **Anexo 3**

#### 3.3. Metodología de las unidades experimentales

En esta investigación se incluyeron 42 vacas repetidoras con endometritis subclínica de raza Holstein Friesian mestizas múltiparas, clínicamente sanas, que no han concebido en  $\geq 3$  servicios consecutivos en ciclos estrales regulares (17 – 23 días), con una condición corporal de 2,5 – 3,0 según la escala de clasificación (1-5) de NIRD (National Institute of Research in Dairying), alimentadas con una dieta basal de 90% de pasturas, 8% de concentrado (maíz, soya, melaza y fibra) y 2% de pre-mezcla de vitaminas y minerales; se excluyeron animales que presenten ciclos estrales irregulares, fluido vaginal anormal y cuadros patológicos detectable al momento del examen ginecológico.



### 3.3.1. Selección de los animales

Las vacas fueron seleccionadas por medio de los registros reproductivos existentes en cada granja alcanzando 14 animales por cada granja (Nero, Irquis y El Carmen); se consideraron vacas con endometritis subclínica aquellas que presentaron  $\geq 5\%$  de células PMN en la citología endometrial utilizando la “técnica de cytobrush”.

### 3.3.2. Muestreo citológico por Técnica Cytobrush

El diagnóstico de endometritis subclínica se lo realizó mediante citología endometrial utilizando la técnica de Cytobrush descrita por Kasimanickam et al., el método consiste en conectar el citocepillo a una pistola de transferencia de embriones, el mismo que se reducirá a 3 cm de largo y se enroscada en una barra de acero inoxidable, y se lo recubrirá con un plástico sanitario para protegerlo de la contaminación vaginal. La vulva es limpia con agua y secada con toallas de papel absorbente, el instrumento será lubricado y pasará a través de la vagina hacia el exterior de la cervix, se perforará el plástico sanitario, y el instrumento avanza a través del cuello uterino, el instrumento entra en el cervix para exponer el citocepillo al endometrio, la muestra fueron tomadas girando el citocepillo en dirección de las manijas del reloj, luego es reintroducido dentro del tubo de acero inoxidable para poder sacarlo del útero. Las placas para la examinación citológica fueron preparadas haciendo rodar el citocepillo en el portaobjetos, rotuladas y fijadas etanol al 70%. Por último, las placas fueron llevadas al Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria, de la Universidad de Cuenca en el menor tiempo posible para ser teñidas con la Tinción de Giemsa.

### 3.3.3. Evaluación citológica

Las muestras fueron evaluadas contando 100 células al azar existentes en un campo utilizando el aumento de 40x (*Olympus, Mod: CX31RBSFA*), y de esas 100 células se cuenta la cantidad polimorfonucleares (PMN) y se expresa en porcentaje. Se preparó dos placas de citología endometrial y fueron evaluadas por dos ocasiones por vaca (**Anexo 9**).





### **3.3.4. Evaluación del diámetro de luz uterina**

En las vacas seleccionadas se realizó una evaluación por vía transrectal mediante el empleo de un equipo de ultrasonido (*Mindray Mod: DP-6600 Vet*), usando un transductor lineal de 7,5 MHz para medir el diámetro de la luz uterina en la base de uno de los cuernos expresando en milímetros, el cual se obtiene al realizar un corte transversal con traductor lineal y medir la distancia entre los bordes del endometrio. Las mediciones fueron obtenidas en la fase del diestro del ciclo estral, se realizaron dos mediciones del diámetro de la luz uterina (antes y después del tratamiento) (**Anexo 10**).

### **3.3.5. Toma de muestras para cultivo bacteriológico y aislamiento de agentes bacterianos**

Las muestras fueron tomadas mediante la técnica de Cytobrush como fue descripta anteriormente en el momento del diagnóstico de endometritis subclínica, para identificar los siguientes agentes bacterianos *Escherichia Coli*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp.* Una vez obtenida la muestra se introdujo el citocepillo en el medio de transporte, en el cual fue colocado en un cooler con refrigerantes hasta su llegada al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca de la Universidad de Cuenca, las muestras fueron sembradas en Agar sangre, Agar Macconkey y Agar nutritivo, la siembra se realizó por diseminación en superficie de cada medio de cultivo utilizando un hisopo estéril posteriormente las placas petri se incubaron en aerobiosis a 37 ° C, examinándose las muestras a las 24 y 48 horas de incubación, las bacterias se identifican por las siguientes características: morfología de colonia y Tinción de Gram.

En aquellas muestras que se observó crecimiento bacteriano, se procedió a realizar la tinción Gram, posteriormente fueron clasificadas las bacterias (Gram positivos y Gram negativos). Las bacterias Gram positivos, fueron sembradas en Agar sal manitol y se realizó pruebas de catalasa. Las Bacterias Gram negativos se sembró en Agar EMB (eosina azul de metileno), prueba catalasa y TSI (Triple azúcar hierro).



## **Tinción de Gram**

La tinción de Gram consiste con la ayuda de un asa de platino estéril se tomar la muestra de la superficie del cultivo bacteriano, se coloca una gota de solución salina estéril sobre un portaobjeto para su suspensión, el portaobjeto que contiene preparación bacteriana es secado al ambiente y procede a realizar la tinción:

En la primera fase de la tinción se colocó cristal violeta sobre la preparación bacteriana, se dejó actuar por un minuto y a continuación se procedió a lavar el portaobjeto con agua destilada. En la segunda fase se añadió el reactivo de lugol, se dejó actuar por un minuto y se procedió a lavar el portaobjeto. En la tercera fase se procedió colocar gota a gota el alcohol acetona, se dejó actuar por 15 segundos y pasado el tiempo se lavó el portaobjeto. En la última fase se colocó el reactivo de safranina, se dejó actuar por 45 segundos y se lavó la preparación. La muestra fue secada al ambiente e inmediatamente se colocó una gota de aceite de inserción sobre el portaobjeto para su observación en microscopio con lente de 100X.

Las bacterias Gram positivos se colorean de violeta, mientras que las Gram negativos se decoloran y captan el color de contraste (Rosado).

### **3.3.6. Aplicación de los tratamientos.**

Luego de las 24 horas del diagnóstico de endometritis subclínica (%PMN  $\geq 5$ ) se les realizó los siguientes tratamientos: G1 (n=21) se aplicó cefapirina benzatínica intrauterina (IU) 500mg y G2 (n=21) se aplicó ozono en una concentración de 45 ug/ml en 50 ml de agua bidestilada tipo II estéril.

### **3.3.7. Evaluación de efecto de tratamientos**

Se evaluó el efecto de los tratamientos a las 72 horas luego de su aplicación, por medio de la técnica de Cytobrush evaluando la cantidad de células PMN; además se realizó una segunda medición del diámetro de la luz uterina, para verificar si existió efecto de los tratamientos.



### **3.3.8. Protocolo de sincronización de celo**

Luego de terminar la fase experimenta inmediatamente las vacas fueron sometidas a protocolo de sincronización de celo. A continuación se va describir el protocolo que se empleó en el estudio.

Día 0 = Implante de progesterona (P4) CIDR + benzoato de Estradiol (EB) de 2 mg

Día 8 = Retiro del implante + aplicación de prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) de 150 mg

Día 9 = benzoato de Estradiol (EB) de 1 mg

Día 10 = Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) + GnRH.

### **3.3.9. Diseño experimental**

Los resultados obtenidos se evaluaron utilizando un Diseño de bloques al Azar (DBA), análisis estadístico consistió en una comparación de medias entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) doble de efecto fijo ( $p < 0.05$ ), para determinar el grado de significancia de las variables. Para establecer relación entre las variable presencia de agentes bacterianos, porcentaje de células PMN, diámetro de luz uterina y porcentaje de concepción con respecto a los tratamientos se emplearon tablas de contingencia. Los datos fueron procesados mediante el software de análisis estadístico *INFOSTAT*, para *Windows 8*.



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

El total de animales que se incluyó en el estudio fueron 42, se dividió en dos grupos G1= Cefapirina benzatinica en suspensión (n= 21) y G2= Agua destilada tipo II ozonificada (n= 21) presentaron las siguientes características (**Tabla 2**):

**Tabla 2 Análisis descriptivo de los grupos seleccionados**

Tratamiento	Días Abiertos	Numero de servicios
G1 (n=21)	279,0 ± 27,40	3,8 ± 0,19
G2 (n=21)	273,9 ± 22,34	3,9 ± 0,25

G1: Cefapirina benzatínica en suspensión, G2: Agua destilada tipo II ozonificada.

##### 4.1. Prevalencia de endometritis subclínica en vacas repetidoras.

**Tabla 3 Diagnostico de endometritis subclínica en vacas repetidoras**

		Haciendas			Total
		Nero	Irquis	El Carmen	
Vacas Repetidoras	Sin Endometritis	15	20	12	47
	%	51,73	58,83	46,15	52,24
	Con Endometritis	14	14	14	42
	%	48,27	41,17	53,85	<b>47,76</b>

Prevalencia de endometritis subclínica en vacas repetidoras durante el tiempo que duro la investigación fue de 47,76 % (42/89) (**Tabla 3**). Este resultado no coinciden por el reportado por Pothmann *et al.*, (60) que obtuvo una prevalencia de ES en VR de 12,7 %, son similares a los encontrados por Salasel *et al.*, (11) 52,7 % en ES en VR, por otro lado varios autores Dogan *et al.*, Javed *et al.*, (80,81) establecieron un rango de endometritis en VR de 14 a 54 %, la diferencia de estos resultados depende del punto de corte utilizados ( $\geq 3$  o 5% de PMN), tamaño de la población en estudio y diferentes factores ambientales que estuvieron expuestos los animales (11).



#### 4.2. Efecto del tratamiento sobre el porcentaje de PMNs.

**Tabla 4 Efecto del tratamiento sobre el porcentaje de PMNs**

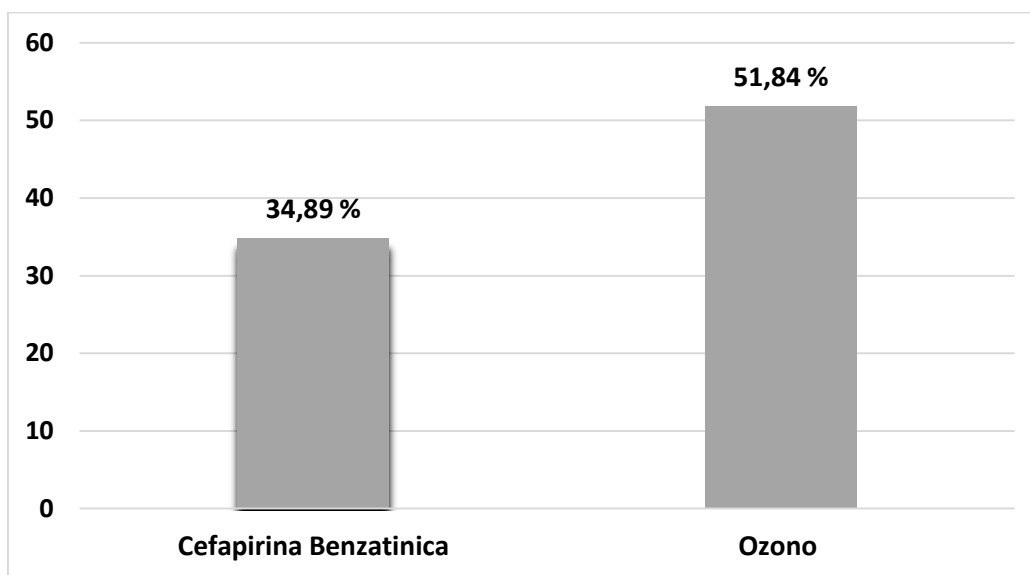
Tratamiento		PMNs Iniciales	PMNs 72 horas post
		(%)	tratamiento (%)
G1= Cefapirina Benzatinica		12,5 ± 0,99	6,5 ± 0,76 <sup>a</sup>
	G2=		
	Ozono	11,5 ± 1,19	4,0 ± 0,52 <sup>b</sup>

a,b diferentes en la misma columna presenta diferencias significativas para un  $P < 0,05$

El porcentaje de PMNs encontrados en vacas repetidoras fue  $12,5 \pm 0,99$  % para el G1 y para el G2 fue  $11,5 \pm 1,19$  %; luego de 72 horas de haber sido aplicado los tratamientos se evaluó su efecto sobre el porcentaje de PMNs mostrando una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre G1=  $6,5 \pm 0,76$  y G2=  $4,0 \pm 0,52$  (**Tabla 4**), es decir que los animales tratados con ozono mostraron una mayor efectividad en la reducción de PMNs.

Un estudio realizado por Madoz *et al.*, (56) considera animales positivos a ES cuando presenta  $\geq 5\%$  de PMNs, después de los 60 días post parto. Por lo tanto, en este estudio se observa que luego de aplicarse el tratamiento con cefapirina benzatinica, el porcentaje de PMNs se encuentra por encima del 5%, mientras que el grupo que recibió  $O_3$  se encuentra por debajo del 5%, según estos resultados el ozono tiene mayor efecto en la recuperación del endometrio en VR con ES, al compararlo con la cefapirina benzatinica ( $P < 0.05$ ).

Varios estudios han demostrados el potencial terapéutico del ozono intrauterina en las vacas Holstein, según los autores el ozono tiene la capacidad de mejorar la regeneración del endometrio, reduce el proceso inflamatorio (disminución de PMNs) (82,83). Además favorece la estimulación del tejido de granulación y epitelización (84).

**Figura 3 Porcentaje de diferencia del efecto de los tratamientos**

Al comparar el efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de PMNs a 72 horas post-tratamiento se observó una diferencia de 16,95 % de eficacia para el ozono sobre la cefapirina benzatinica (**Figura 3**).

Estos resultados difieren con los reportadas por Maldonado *et al.* (2017) que investigaron la efecto del ozono vs cefapirina benzatinica en vacas lecheras con ES durante el postparto, en donde obtuvieron una reducción significativa de PMNs con la administración ozono intrauterino del 78,8 % versus 61,7% de los animales tratados con cefapirina benzatinica. Esto se podría explicar que el ozono es más eficaz cuando se realice un diagnóstico y tratamiento temprano de en endometritis subclínica en vacas lecheras.

#### **4.3. Efecto del tratamiento sobre el Diámetro de luz uterina.**

El diámetro de la luz uterina inicial en vacas repetidoras fue  $2,23 \pm 0,14$  (mm) para el G1 y para el G2 fue  $2,23 \pm 0,14$  (mm); luego de 72 horas de haber sido aplicado los tratamientos se evaluó por segunda vez efecto sobre el diámetro de luz uterina; no mostrando diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre el G1=  $1,72 \pm 0,08$  (mm) y para el G2 =  $1,62 \pm 0,13$  (mm) (**Tabla 5**).

**Tabla 5 Efecto del tratamiento sobre el diámetro de luz uterina**

Tratamiento		Diámetro luz uterina (mm)	Diámetro luz uterina(mm) 72 horas post tratamiento
Tratamiento	G1= Cefapirina Benzatinica	2,23 ± 0,14	1,72± 0,08 <sup>a</sup>
	G2= Ozono	2,21 ± 0,12	1,62 ± 0,13 <sup>a</sup>

a,b diferentes en la misma columna presenta diferencias significativas para un  $P < 0,05$

Luego de aplicar los tratamientos el 77.41 % (33/42) de vacas tratadas disminuyeron el diámetro de luz uterina  $< 2$  mm: en cambio el 22.59 % (9/42) de las vacas tratadas presentaron un diámetro de luz uterina  $\geq 2$  mm. Lo cual demuestra la efectividad del cefapirina benzatinica y en ozono en la disminución de la luz uterina en VR.

Estudios de Mateus *et al.*, (85) afirma que la presencia de luz uterina a partir de la cuarta semana post parto indica que existe un proceso inflamatorio activo esto se puede evidenciar con la presencia de PMNs. La presencia de luz uterina puede ser un indicativo de endometritis subclínica en ganado bovino (58,61), lo cual podría tener un efecto negativo sobre el desarrollo y supervivencia del embrión, disminuyendo el porcentaje de concepción (86,87).

Por otro lado, al ser una investigación que evalúa el efecto del ozono sobre el diámetro de la luz uterina, no existe información suficiente para contrastar los resultado obtenidos sobre la reducción de la luz uterina, sin embargo la presente investigación fue comprobar la relación del diámetro de luz uterina entre la fertilidad en vacas, como se analizará más adelante.

#### 4.4. Relación del diámetro de luz uterina post-tratamiento sobre la fertilidad.

**Tabla 6** Relación del diámetro de luz uterina post-tratamiento sobre la fertilidad

	Diámetro luz uterina post-tratamiento		Total
	$< 2$ mm	$\geq 2$ mm	
<b>Preñez</b>	16	1	<b>17</b>
<b>%</b>	94,12	5,88	100,0

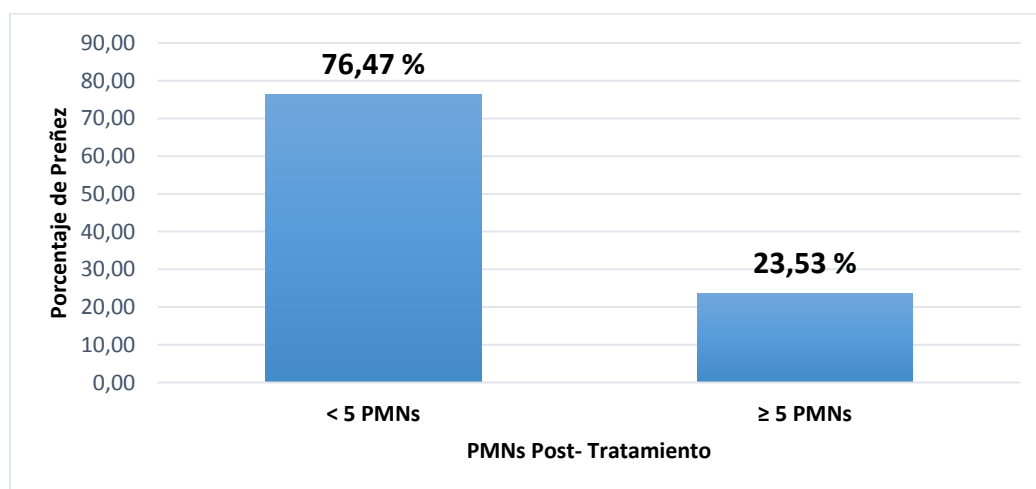
El porcentaje de preñez en vacas repetidoras con  $< 2$  mm de diámetro de luz uterina post-tratamiento fue 94.12 % (16/17), mientras que el porcentaje de preñez en VR con  $\geq 2$  mm de diámetro de luz uterina post-tratamiento fue 5.88 % (1/17) (**Tabla 6**). Estos resultados nos demuestran que vacas repetidoras con  $< 2$  mm de diámetro de luz uterina tienen una mayor probabilidad de preñez en la posterior inseminación artificial comparándolas a las VR con  $\geq 2$  mm luz uterina (probabilidad ajustada = 0,1307;  $p = 0,6303$ ) (**Anexo 20**).

Estos resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a otros estudios, en donde determinaron un mayor desempeño reproductivo en vacas con un diámetro de luz uterina  $< 2$  mm; mientras un diámetro de luz uterina mayor  $\geq 2$  mm tiene una asociación negativa con el porcentaje de preñez a la siguiente IA (88).

Varias investigaciones sobre el diagnóstico de endometritis subclínica en ganado lechero mediante ultrasonografía demostraron que el diámetro de luz uterina varía de acuerdo a la fase del ciclo estral (fase del proestro y estro fisiológicamente existe mayor abertura de la luz uterina, mientras en la fase diestro existe una menor diámetro de luz uterina) y número de partos (vacas primíparas presentan un menor diámetro de luz uterina y vacas multíparas hay una mayor abertura de luz uterina) (89,90)

#### 4.5. Relación de los PMNs post-tratamiento entre la fertilidad

**Figura 4 Porcentaje de Preñez en relación a los PMNs Post-Tratamiento.**







El porcentaje de PMNs después de las 72 horas de haber aplicado los tratamiento mostro una diferencia estadísticamente entre los porcentaje de preñez ( $p < 0,05$ ); existe una diferencia al porcentaje de preñez de 52,93 % entre los animales con  $< 5$  PMNs y con  $\geq 5$  PMNs (**Figura 4**). Es decir el porcentaje de PMNs ( $< 5$  PMNs) indica que el proceso infeccioso e inflamatorio local se ha reducido, creando un ambiente uterino favorable para la concepción.

Por lo tanto, vacas que presentan porcentajes de PMNs superiores al umbral ( $\geq 5$  PMNs), empiezan a manifestar una disminución de su performance reproductiva(91,92).

#### 4.6. Aislamientos bacterianos de vacas repetidoras con endometritis subclínica.

**Tabla 7 Aislamientos Bacterianos**

Bacterias	Endometritis Subclínica	
	%	(n/N.)
Staphylococcus spp.	45,24 %	(19/42)
Escherichia Coli	9,5 %	(4/42)
Pseudomonas Spp.	7,4 %	(3/42)
Bacillus spp.	9,5 %	(4/42)
Sin Aislamiento	38,0 %	(16/42)

Los resultados de los cultivos bacteriológicos demostraron que el 62 % (26/42) presentaron crecimiento bacteriano y el 38 % (16/42) de las vacas repetidoras con endometritis subclínica no presentaron aislamiento bacteriano. Los principales agentes bacterianos aislados de la mucosa uterina fueron *Staphylococcus spp* 42.24 %, *Echerichia Coli* 9,5 %, *Bacillus spp* 9,5 % y *Pseudomonas spp* 7,4 % como se muestran en la (**Tabla 7**).

Estos resultados obtenidos coinciden con Pothmann, (60); en donde evaluaron la prevalencia de endometritis subclínica y la presencia de agentes bacterianos en vacas repetidoras; en cual el 47,1% de las muestras no se encontraron aislamiento



bacteriano, las principales bacterias aisladas en este estudio fueron *Trueperella pyogenes* (0.8%), *Escherichia coli* (2.5%), *Corynebacterium spp.* 20.7%, *Streptococcus spp.* 19.0% y *Staphylococcus spp.* 14.9%.

Los principales agentes bacterianos aislados en 37 vacas repetidoras mediante biopsia uterina encontraron el 62,2 % de las muestras presentaron crecimiento bacteriano; donde predominó *Staphylococcus* (37.8%), *Bacillus* (35.1%), *E. coli* (29.7%) y *Pseudomonas* (18.9 %) (26).

Un estudio sobre aislamiento de agentes bacterianos intrauterino en vacas repetidoras con endometritis subclínica el 50 % de las muestras no presentaron aislamiento bacteriano, los autores explican posiblemente en el momento del diagnóstico de ES, las bacterias han sido eliminadas del útero los mecanismo de defensas, mientras que el proceso inflamatorio endometrial se encontraba en fase de regresión hacia la normalidad, por lo cual existía PMNs por encima del punto corte de ES (91) . Este postulado está de acuerdo con Barański, (58); afirma que vacas diagnosticadas con endometritis subclínica (encima del umbral  $\geq 5$  PMNs ) se encuentra relacionado con la involución uterina y recuperación del histológica del endometrio que con una infección bacteriana.

#### 4.7. Efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de preñez

Tabla 8 Porcentaje de preñez

Tratamiento	N. de vacas preñadas	% de Preñez
G1 (n=21)	7	33,0 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
G2 (n=21)	10	48,0 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>

a,b diferentes en la misma columna presenta diferencias significativas para un  $P < 0,05$

G1: Cefapirina benzatínica en suspensión, G2: Agua destilada tipo II ozonificada.

En este estudio, el 40.48 % (17/42) de las vacas repetidoras con endometritis subclínica concibieron. El porcentaje de preñez fue del 33,33 % (7/21) en grupo tratadas con cefapirina benzatínica y los animales tratados con ozono alcanzaron



un porcentaje de preñez del 48,0 %, los tratamientos no mostraron diferencia estadística ( $P>0.05$ ) (**Tabla 8**) sin embargo, existe mayor probabilidad de recuperar la fertilidad en animales tratados con ozono (**Anexo 19**).

Maldonado *et al.*, (2017) demostrando un efecto positivo del uso de la ozonoterapia vs una infusión de 500 mg de cefapirina benzatínica por vía intrauterina para el control de ES en vacas Holstein durante el postparto en vacas lecheras; obteniendo un porcentaje de preñez al primer servicio del 66 % en animales tratados con ozono y un 41,2 % de preñez en los animales tratados con cefapirina benzatinica ( $P<0,05$ ), esta diferencia estadística se debería ya que los animales fueron tratados entre 34 – 47 DPP. Esto nos puede decir un mayor efecto terapéutico del ozono durante el postparto.

Este resultado fueron similares a un estudio realizado en Portugal, en donde aplicaron pajillas ozonificas (*Ripromed palhinhos®*) 10 horas antes de la inseminación artificial en VR de raza Holstein – Friesian donde obtuvieron 43 % de preñez en los animales tratados; mientras un 26 % de concepción en animales no tratados (93).

Por otro lado, Samardžija *et al.*, (82) investigaron la eficacia del ozono intrauterino en vacas repetidoras con o sin crecimiento bacteriano; aplicando un aerosol de espuma ozonificada (*Riger spray, Novagen*) en 34 animales obtenido 33 y 60 % de preñez respectivamente.

Zobel, (94) indica en su estudio, diversos tratamientos para endometritis en vacas Simmental, en cual puso a prueba la eficiencia del ozono intrauterino mediante un ensayo de tres grupos Grupo A ( $\text{PGF2}\alpha$ ), Grupo B (cefapirina +  $\text{PGF2}\alpha$ ) y Grupo C (ozono +  $\text{PGF2}\alpha$ ) y, en Grupo C obtuvieron mayor número de vacas concebida después de la primera inseminación artificial posterior al tratamiento ( $p < 0,05$ ).



## 5. CONCLUSIONES

Al finalizar la investigación se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La administración intrauterina de ozono reduce significativamente el porcentaje de PMN en vacas repetidoras con endometritis subclínica, siendo mejor que el tratamiento alopático (cefapirina benzatinica).
- Ambos tratamientos reducen el diámetro de la luz uterina y mejoran la preñez, pero no difieren entre ellos, aun así, el uso de la ozonoterapia proporciono una mayor recuperación de la fertilidad en vacas repetidoras.
- De las 42 vacas repetidoras con endometritis subclínica, 26 presentaron aislamientos bacterianos para *Staphylococcus spp* 42,24 %, *Escherichia Coli* 9,5 %, *Bacillus spp* 9,5 % y *Pseudomonas spp* 7,4 %.



## 6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar esta investigación con un mayor número de animales para aprovechar el potencial antimicrobiano del ozono frente a los antibióticos en procesos infecciosos endometriales en ganado bovino.
- Debido al impacto negativo que tiene síndrome de vaca repetidora en la reproducción se recomienda realizar un diagnóstico temprano de la misma y definir su origen, para evitar pérdidas reproductivas y económicas en los hatos ganaderos.
- Para futuras investigaciones se recomienda realizar pruebas de sensibilidad de los agentes bacterianos uterinos y su resistencia a los antibióticos.
- La endometritis subclínica es una de las causas de VR, por lo que se requiere más estudios para comprender los mecanismo causante del SVR y de esta forma emplear un tratamiento efectivo.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Dobson H, Smith R, Royal M, Knight C, Sheldon I. The high-producing dairy cow and its reproductive performance. *Reprod Domest Anim.* 2007;42 Suppl 2(Suppl 2):17-23.
2. Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2011;123(3-4):127-38.
3. Oltenacu PA, Algers B. Selection for Increased Production and the Welfare of Dairy Cows: Are New Breeding Goals Needed? *Ambio.* 2005;34:311-5.
4. Tillard E, Humblot P, Faye B, Lecomte P, Dohoo I, Bocquier F. Postcalving factors affecting conception risk in Holstein dairy cows in tropical and sub-tropical conditions. *Theriogenology.* 2008;69(4):443-57.
5. Warriach HM, Ahmad N, Ahmad G, Khan MS, Rabbani M, Ahmad I. Effect of antibiotic treatment on pregnancy rate of repeat breeder dairy cross bred cows with sub-clinical uterine infection [Internet]. Vol. 28, *Pakistan Vet. J.* 2008.
6. Yusuf M, Nakao T, Ranasinghe RBK, Gautam G, Long ST, Yoshida C, et al. Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology.* 2010;73(9):1220-9.
7. Bartlett PC, Kirk JH, Mather EC. Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Theriogenology.* 1986;26(3):309-22.
8. Francos G, Davidson M, Mayer E. The influence of some nutritional factors on the incidence of the repeat breeder syndrome in high producing dairy herds. *Theriogenology.* 1977;7(3):105-11.
9. Gustafsson H, Emanuelson U. Characterisation of the repeat breeding syndrome in Swedish dairy cattle. *Acta Vet Scand.* 2002;43(2):115-25.
10. Azawi OI. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2008;105(3-4):187-208.



11. Salasel B, Mokhtari A, Taktaz T. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*. 2010;74(7):1271-8.
12. Elvis A, Ekta J. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2(1):66.
13. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci*. 1999;56(4):270-9.
14. Elmetwally MA. Uterine Involution and Ovarian Activity in Postpartum Holstein Dairy Cows. A Review. *J Vet Healthc*. 2018;1(4):29-40.
15. Schroeder W. Fisiología Reproductiva de la Vaca. Celsius. Alemania ; 1999.
16. Arthur G, Noakes D, Garnsworthy P. Reproducción y Obstetricia en Veterinaria. Sexta. Madrid: Interamericana; 1992.
17. Cordova L. Reproducción aplicada en ganado Bovino. Mexico; 2005.
18. Derivaux J. Reproducción de los animales domesticos. Acribia. Zaragoza - España; 1986.
19. Pascual I. Produccion Animal [Internet]. 2007. p. 144.
20. Heppelmann M, Brömmeling A, Weinert M, Piechotta M, Wrenzycki C, Bollwein H. Effect of postpartum suppression of ovulation on uterine involution in dairy cows. *Theriogenology*. 2013;80(5):519-25.
21. Ruiz L, Sandoval R, Montenegro M, Delgado A. Desempeño Reproductivo de Vacas Lecheras con Involución Uterina Retardada bajo Tratamiento Hormonal con Cipionato de Estradiol y Benzoato de Estradiol. *Rev Investig Vet del Perú*. 2017;28(1):110.
22. Mochow R, Olds D. Effect of Age and Number of Calvings on Histological Characteristics of the Bovine Uterus. *J Dairy Sci*. 1966;49(6):642-6.



23. Sheldon I., Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:295-306.
24. Hafez E. Reproduccion e Inseminación Artificial en animales. McGraw-Hil. México.; 2002.
25. Hussain AM. Bovine Uterine Defense Mechanisms: A Review. *J Vet Med Ser B.* 1989;36(1-10):641-51.
26. Gani M, Amin M, Alam M, Kayesh M, Karim M, Samad M, et al. Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. *Bangladesh J Vet Med.* 1970;6(1):79-86.
27. Moges N, Regassa F, Yilma T, Unakal CG. Isolation and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria from Dairy Cows with Clinical Endometritis. *J Reprod Infertil.* 2013;4(1):4-08.
28. LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *Vet J.* 2008;176(1):102-14.
29. Kaper JB. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6-7):355-6.
30. Dolezel R, Palenik T, Cech S, Kohoutova L, Vyskocil M. Bacterial contamination of the uterus in cows with various clinical types of metritis and endometritis and use of hydrogen peroxide for intrauterine treatment [Internet]. Vol. 55, Original Paper *Veterinarni Medicina.* 2010.
31. Williams EJ, Herath S, England GCW, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Effect of *Escherichia coli* infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell. *animal.* 2008;2(8):1153-7.
32. Santos TMA, Gilbert RO, Caixeta LS, Machado VS, Teixeira LM, Bicalho RC. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part II: In vitro antimicrobial activity evaluation of a bacteriophage cocktail and several antibiotics. *J Dairy*





Sci. 2010;93(1):105-14.

33. Seija V. Género *Staphylococcus*. En: Etiopatogenia y microbiológica. 2008. p. 257-271.
34. Méndez-Leal DC, Góngora-Orjuela A, Gómez-Leal LA. Aislamiento e identificación de la flora bacteriana uterina en vacas donantes de embriones. Orinoquia. 2014;18(1):86.
35. Quinn PJ. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. 2005. 93-98 p.
36. Ocando JB, Nava SZ, Nava J, Portillo Martínez G. Perfil de la flora bacteriana vaginal. un riesgo potencial para la reproducción de vacas criollo limonero [Internet]. Vol. XX. 2010.
37. Bondurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. J Anim Sci. 1999;77(suppl\_2):101.
38. Turner M, Healey G, Sheldon I. Immunity and Inflammation in the Uterus. Reprod Domest Anim. 2012;47:402-9.
39. Laing J, Morgan W. Fertilidad e infertilidad en la practica veterinaria. Cuarta. Editorial Interamericano; 1991. 110-115 p.
40. Gautam G, Nakao T, Yamada K, Yoshida C. Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. Theriogenology. 2010;73(2):180-9.
41. Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. J Dairy Sci. 2012;95(4):1845-54.
42. Galvão K, Frajblat M, Butler W, Brittin S, Guard C, Gilbert R. Effect of Early Postpartum Ovulation on Fertility in Dairy Cows. Reprod Domest Anim. 2009;45(5):e207-11.



43. Cano P. Diagnostico y tratamiento de los principales problemas reproductivos en los bovinos. Mexico; 2012.
44. Guerrero B. Diagnostico y tratamiento de la vaca repetidora de servicios. En: VII Seminario Competitividad en Carne y Leche. Colombia; 2010. p. 11.
45. Jaureguiberry M. Diagnóstico y tratamiento de vacas repetidoras en tambos de la cuenca abasto sur [Internet]. Universidad Nacional de la Plata; 2017.
46. Rodriguez-Martinez H, Hultgren J, Båge R, Bergqvist A-S, Svensson C, Bergsten C, et al. Reproductive performance in high-producing dairy cows. 2008;
47. Båge R, Gustafsson H, Larsson B, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H. Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology*. 2002;57(9):2257-69.
48. Gomez de Freitas S. Anestro pós-parto em vacas de corte. En: Seminario apresentado na disciplina endocrinologia da reproducao. Brazil; 2002. p. 11.
49. Giuliadori MJ, Delavaud C, Chilliard Y, Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido I, de la Sota RL. High NEFA concentrations around parturition are associated with delayed ovulations in grazing dairy cows. *Livest Sci*. 2011;141(2-3):123-8.
50. Jaureguiberry M, Madoz LV, de la Sota R. An update on repeat breeding cows. *Rev Taurus*. 2015;
51. Moyano M, Rodriguez C. Suplementación energética y su efecto en el nivel de colesterol y el perfil hormonal preovulatorio en vacas. *Rev Salud Anim*. 2014;36.
52. Wodaje HB, Mekuria TA. Risk Factors of Repeat Breeding in Dairy Cattle. *Adv Biol Res (Rennes)*. 2016;10(4):213-21.
53. Katagiri S. A New Approach to Repeat Breeding in Cows: Treatments



Targeting the Endometrial Growth Factor-cytokine Network [Internet]. Vol. 41, Thai J Vet Med. 2011.

54. Sheldon I., Owens S. Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. *Anim Reprod*. 2017;14(3):622-9.
55. Földi J, Kulcsár M, Pécsi A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis JACM, et al. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2006;96(3-4):265-81.
56. Madoz L V, Giuliodori MJ, Jaureguiberry M, Plöntzke J, Drillich M, de la Sota RL. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci*. 2013;96(7):4333-9.
57. Reategui J, Fernandez F, Rinaudo A, Cuadros S, Marini P. Endometritis subclinica en el postparto de vacas lecheras en sistema intensivos de producción de leche, Arequipa. *Spermova*. 2014;1.
58. Barański W, Podhalecz-Dzięgielewska M, Zduńczyk S, Janowski T. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. *Theriogenology*. 2012;78(9):1939-47.
59. Couto GB, Vaillancourt DH, Lefebvre RC. Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 2013;79(1):103-7.
60. Pothmann H, Prunner I, Wagener K, Jaureguiberry M, de la Sota RL, Erber R, et al. The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology*. 2015;83(8):1249-53.
61. Kasimanickam R, Duffield T., Foster R., Gartley C., Leslie K., Walton J., et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 2004;62(1-2):9-23.
62. Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonography of the bovine ovary.



Theriogenology. 1984;21(3):495-504.

63. Polat B, Cengiz M, Cannazik O, Colak A, Oruc E, Altun S, et al. Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis. *Anim Reprod Sci.* 2015;155:50-5.
64. Dourey A, Colazo MG, Barajas PP, Ambrose DJ. Relationships between endometrial cytology and interval to first ovulation, and pregnancy in postpartum dairy cows in a single herd. *Res Vet Sci.* 2011;91(3):e149-53.
65. Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology.* 2008;69(6):714-23.
66. Maldonado H, Narvaéz J, Enriquez M, Ortuño C. Uso de la ozonoterapia para el control de la endometritis subclínica postparto en vacas lecheras. *Maskana.* 2017;
67. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J = La Rev Vet Can.* 2005;46(3):255-9.
68. Mari G, Iacono E, Toni F, Predieri PG, Merlo B. Evaluation of the effectiveness of intrauterine treatment with formosulphathiazole of clinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 2012;78(1):189-200.
69. Đuričić D, Valpotić H, Samardžija M. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. *Anim Reprod Sci.* 2015;159:1-7.
70. Hidalgo-Tallón FJ, Torres LM. Ozonoterapia en medicina del dolor. Revisión [Internet]. Vol. 20, *Rev Soc Esp Dolor.* 2013.
71. Djuricic D, Vince S, Ablondi M, Dobranic T, Samardzija M. Effect of Preventive Intrauterine Ozone Application on Reproductive Efficiency in Holstein Cows. *Reprod Domest Anim.* 2012;47(1):87-91.



72. Đuričić D, Valpotić H, Samardžija M. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. *Anim Reprod Sci.* 2015;159:1-7.
73. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res.* 2006;37(4):425-35.
74. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug. 2009;
75. Martinez G. La ozonoterapia gana evidencias científicas en el campo clínico. *Rev Cuba Farm.* 2013;47(1):1-4.
76. Menendez S, Gonzalez R, Ledea O, Hernandez F, Leon O, Diaz G. El Ozono: Aspectos Básicos y sus Aplicaciones Clínicas. [Internet]. 2008.
77. Freire RP. Tratamiento profiláctico con Ozono y Lidocaína al 0.5% intrauterino en las primeras doce horas posparto sobre las infecciones uterinas en ganado lechero en Zamorano [Internet]. Universidad Zamorano; 2011.
78. Zobel R, Tkalčić S, Štoković I, Pipal I, Buić V. Efficacy of Ozone as a Novel Treatment Option for Urovagina in Dairy Cows. *Reprod Domest Anim.* 2012;47(2):293-8.
79. Zobel R, Tkalcic S, Cole W. Fertility issues in Simmental cows in Central Croatia: a 5-year study. *TURKISH J Vet Anim Sci.* 2013;37:454-61.
80. Dogan I, Sonmez G, Sagirkaya H. Histopathological investigation of endometrium in repeat breeder cows. *Indian J Anim Sci.* 2002;72:223-6.
81. Javed MT, Khan MZ. Bacteriological and bio-histopathological studies in repeat breeding cows. *J Islam Acad Sci.* 1991;4:242-4.
82. Samardžija M, Dobranić T, Prvanović Babić N, Lojkić M, Folnožić I, Đuričić D. Effect of intrauterine ozone treatment in cows with repeat-breeding syndrome after bacteriological testing of uterine swabs. *Proc 18th Annu Conf Eur Soc Domest Anim Reprod.* 2014;93.



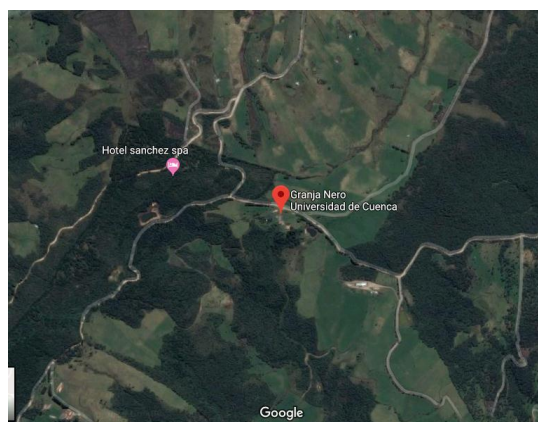
83. Merhi Z, Garg B, Moseley-LaRue R, Moseley A, Smith A, Zhang J. Ozone therapy: a potential therapeutic adjunct for improving female reproductive health. *Med Gas Res.* 2019;9(2):0.
84. Re L, Mawsouf MN, Menéndez S, León OS, Sánchez GM, Hernández F. Ozone Therapy: Clinical and Basic Evidence of Its Therapeutic Potential. *Arch Med Res.* 2008;39(1):17-26.
85. Mateus L, Lopes Da Costa L, Bernardo F, Robalo Silva J. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 2002;37(1):31-5.
86. He R-H, Gao H-J, Li Y-Q, Zhu X-M. The associated factors to endometrial cavity fluid and the relevant impact on the IVF-ET outcome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8(1):46.
87. Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, Marczuk J. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Vet Res Commun.* 2015;39(2):143-9.
88. Lenz M, Drillich M, Heuwieser W. [Evaluation of the diagnosis of subclinical endometritis in dairy cattle using ultrasound]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2007;120(5-6):237-44.
89. Salah N, Yimer<sup>1</sup> N. Cytological endometritis and its agreement with ultrasound examination in postpartum beef cows. *Vet World.* 2017;10(2231-0916):605-9.
90. Quintela L, Vigo M, Becerra J, López M, García J, Peña A. Subclinical Endometritis in Dairy Cattle. En: *New Insights into Theriogenology.* IntechOpen; 2018.
91. De La Sota R, Vanina Madoz L, Jaureguiberry M, Dominguez G, Migliorisi AL, Albarracín D, et al. Subclinical endometritis in dairy cows: diagnosis, prevalence and impact over reproductive efficiency [Internet]. Vol. 4. 2014.



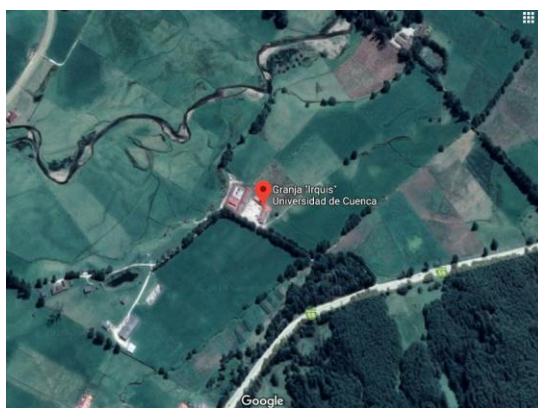
92. Rutter B. Diagnostico de endometritis subclínica en vacas lecheras. Maskana. 2016;6(Supl.):131-42.
93. Luz NFV da. Estudo do efeito da aplicação intrauterina de ozono sobre a taxa de gestação, após inseminação artificial, em vacas repetidoras de raça Frísia Holstein. 2013;
94. Zobel R. Endometritis in Simmental cows: incidence, causes, and therapy options. Turkish J Vet Anim Sci. 2013;37:134-40.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1 Ubicación de la Granja Nero



### Anexo 2 Ubicación de la Granja Irquis



### Anexo 3 Ubicación de la Hacienda El Carmen



**Fuente:** Directorio cartográfico de Google Maps, 2019.





## Anexo 4 Equipo para Citología endometrial



## Anexo 5 Técnica de Cytobrush





## Anexo 6 Toma de muestra Citología y Cultivo Bacteriano





## Anexo 7 Equipo Ozonificador

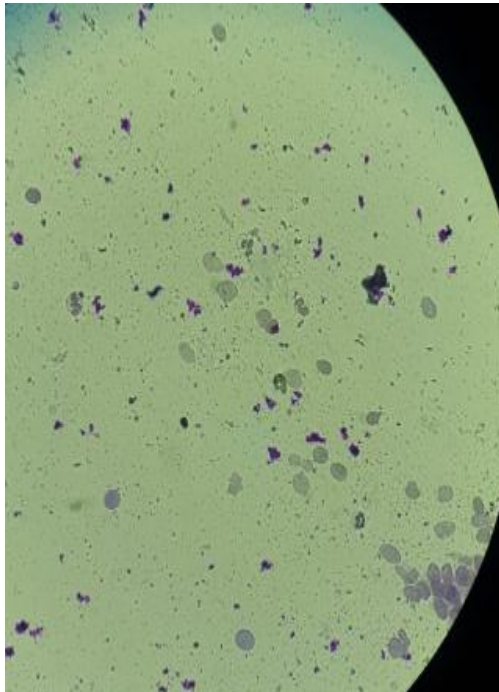


## Anexo 8 Tinción de Giemsa

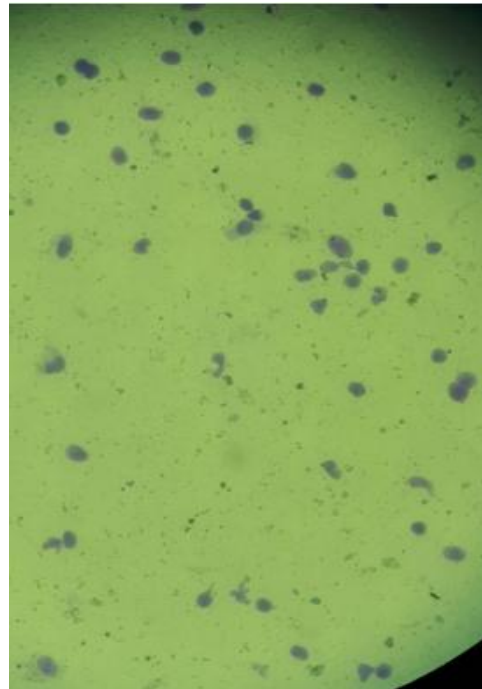




## Anexo 9 Valoración Citológica



**Antes del Tratamiento**



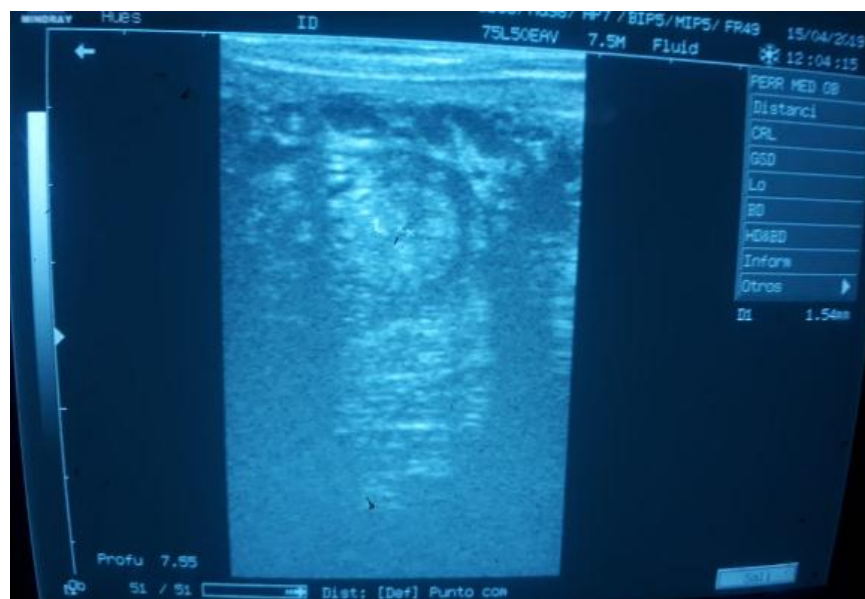
**Después del Tratamiento**

## Anexo 10 Medición del diámetro de luz uterina mediante Ultrasonografía





Antes del Tratamiento



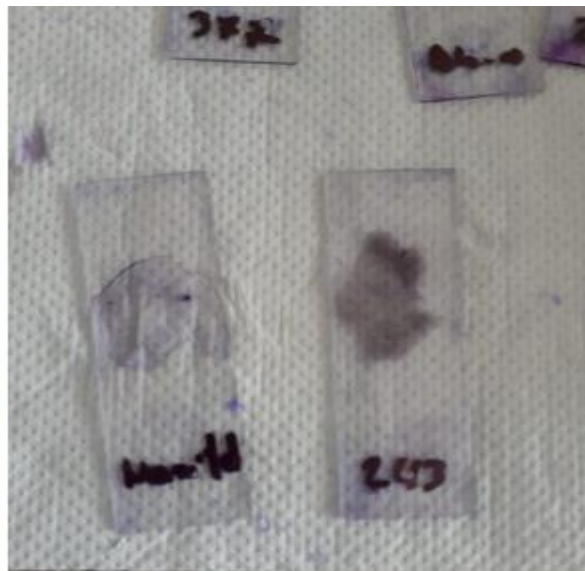
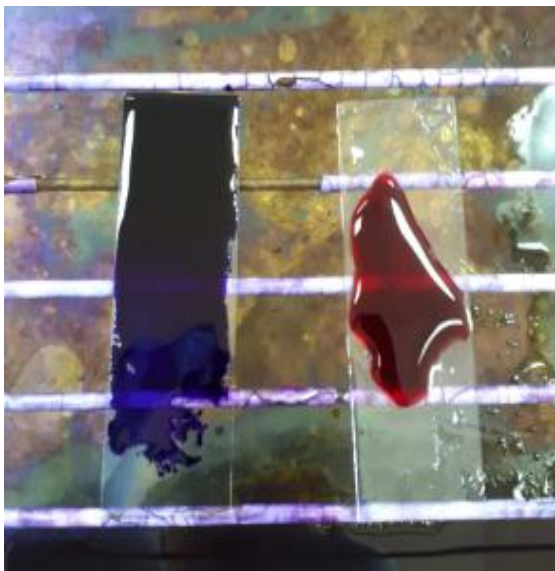
Después del Tratamiento



## Anexo 11 Preparación medios de cultivos

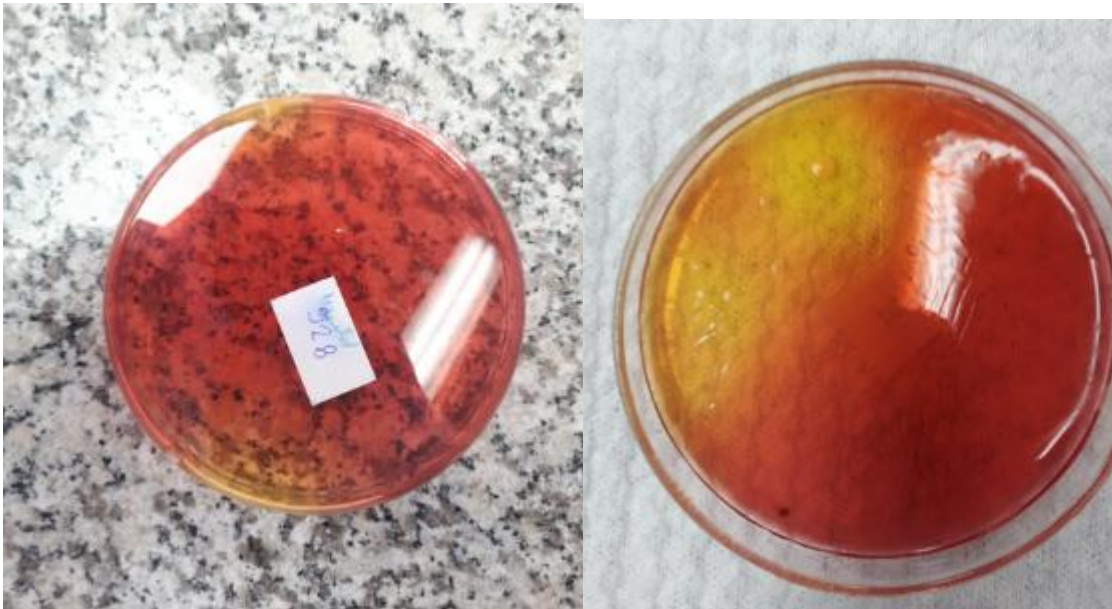


## Anexo 12 Tinción de Gram

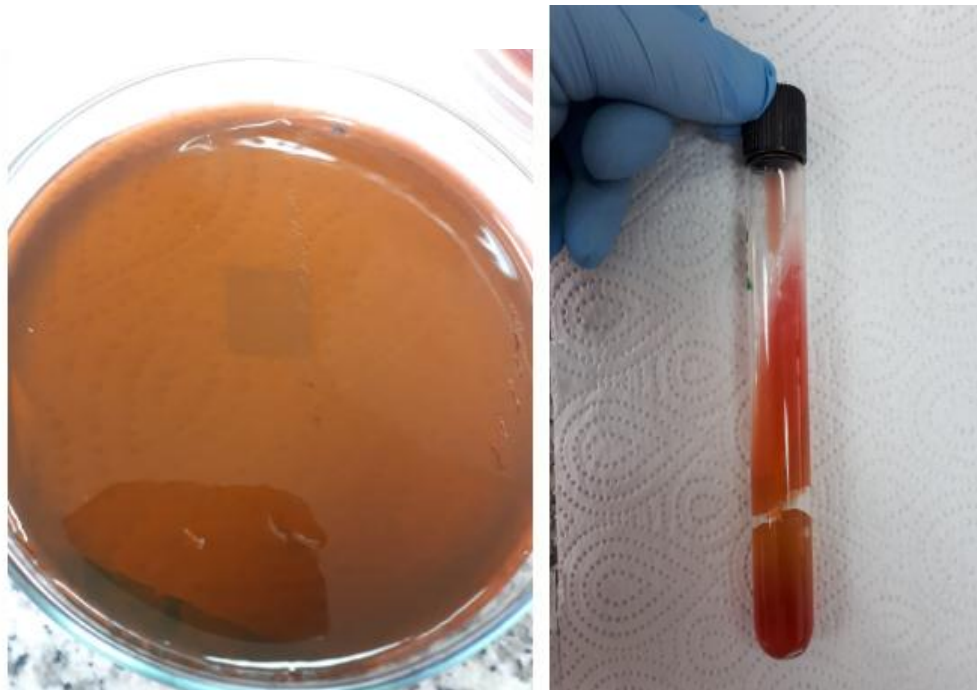




### Anexo 13 Staphylococcus spp. en Agar Sal Manitol



### Anexo 14 Echerichia Coli





## Anexo 15 *Bacillus* spp



## Anexo 16 *Pseudomonas* Spp.





**Anexo 17 Promedio de la Variable PMNs a 72 horas pos tratamiento**

Tratamiento	Media	Error Estándar	Límite de Confianza al 95 %	
			Mínimo	Máximo
Cefapirina	6,48	0,76	4,9	8,06
Benzatinica				
Ozono	4,02	0,52	2,93	5,12

**Anexo 18 Promedio de la Variable Diámetro de luz uterina Pos Tratamiento**

Tratamiento	Media	Error Estándar	Límite de Confianza al 95 %	
			Mínimo	Máximo
Cefapirina	1,72	0,08	1,56	1,87
Benzatinica				
Ozono	1,62	0,13	1,35	1,88

**Anexo 19 Promedio de la Variable Preñez**

Tratamiento	Media	Error Estándar	Límite de Confianza al 95 %	
			Mínimo	Máximo
Cefapirina	0,33	0,11	0,11	0,55
Benzatinica				
Ozono	0,48	0,11	0,24	0,71

**Anexo 20 Relación del Diámetro luz uterina final entre preñez**

<b>Diámetro Luz Uterina Post-Tratamiento</b>				
		<b>&lt; 2 mm</b>	<b>≥ 2 mm</b>	<b>Total</b>
<b>Preñez</b>	<b>Preñada</b>	16	1	17
	<b>%</b>	94,12	5,88	100,0
	<b>Vacía</b>	17	8	25
	<b>%</b>	68,00	32,00	100,0

**Anexo 21 Efecto de los tratamientos sobre los PMNs finales**

<b>PMNs Post-Tratamiento</b>				
		<b>&lt; 5 PMNs</b>	<b>≥ 5 PMNs</b>	<b>Total</b>
<b>Tratamiento</b>	<b>Metricure</b>	9	12	21
	<b>%</b>	42,86	57,14	100,0
	<b>Ozono</b>	18	3	21
	<b>%</b>	85,75	14,29	100,0



## Anexo 22 Modelo de la hoja de campo

Hacienda El Carmen

N.	N. ARETE	Parto	Días Abiertos	Numero Servicios	TX	PMN Iniciales	Diámetro luz uterina Inicial	PMN Finales	Diam_p ost Final	PREÑEZ	Agentes Bacterianos
1	35832	18-ene.-18	200	3	Metricure	15	2,40	10	2,00	Vacia	Echericha Coli Bacillus spp.
2	24579	21-jul.-17	582	5	Metricure	10	1,60	6	1,20	Preñada	Sin Aislamiento
3	2496	15-ene.-18	250	4	Metricure	16	3,06	10	1,69	Vacia	Pseudomonas spp.
4	2560	24-may.-18	200	5	Metricure	14	1,98	6	1,31	Vacia	Staphylococcus spp.
5	31612	03-nov.-18	176	3	Metricure	7	2,52	2	1,26	Preñada	Sin Aislamiento
6	414	31-oct.-18	153	3	Metricure	9	2,87	4	2,00	Vacia	Sin Aislamiento
7	780	19-nov.-17	430	4	Metricure	6	1,99	3	1,86	Vacia	Sin Aislamiento
8	182	4-ene.-19	300	4	OZONO	5	2,20	1	0,90	Vacia	Sin Aislamiento
9	111	19-dic.-18	270	4	OZONO	7	1,90	3	1,54	Vacia	Sin Aislamiento
10	123	13-ene.-19	169	3	OZONO	21	2,00	10	1,80	Preñada	Bacillus spp.
11	146	13-ene.-19	189	3	OZONO	11	2,50	5	0,92	Preñada	Sin Aislamiento
12	528	22-dic.-18	250	5	OZONO	7	2,10	2	1,21	Vacia	Staphylococcus spp.
13	33636	23-oct.-18	212	3	OZONO	9	2,20	4	1,25	Vacia	Sin Aislamiento
14	07501	24-nov.-18	250	3	OZONO	7	3,00	3	1,33	Preñada	Sin Aislamiento

## Hacienda Irquis

N.	N. ARETE	Parto	Días Abiertos	Numero Servicios	TX	PMN Iniciales	Diámetro luz uterina Inicial	PMN Finales	Diam luz uterina Final	PREÑEZ	Agentes Bacterianos
1	554	15-oct.-18	183	3	Metricure	11	1,68	6	1,63	Preñada	Staphylococcus spp.
2	400	30-ago.-18	247	4	Metricure	8	2,00	5	2,00	Vacia	Sin Aislamiento
3	243	13-jun.-17	400	6	Metricure	10	1,28	4	1,27	Vacia	Staphylococcus spp.
4	329	23-dic.-17	479	5	Metricure	19	2,34	8	2,40	Vacia	Staphylococcus spp.
5	343	30-jul.-18	164	4	Metricure	12	1,68	5	1,78	Preñada	Staphylococcus spp.
6	377	22-feb.-18	322	3	Metricure	15	1,89	8	1,87	Preñada	Staphylococcus spp.
7	369	29-jul.-18	261	3	Metricure	18	1,61	9	1,48	Vacia	Staphylococcus spp.
8	384	15-sep.-18	400	7	OZONO	19	2,17	10	2,00	Vacia	Echericha Coli Staphylococcus spp.
9	401	15-sep.-18	400	6	OZONO	10	2,16	3	1,92	Vacia	Pseudomonas spp.
10	420	23-nov.-18	225	4	OZONO	6	2,10	2	1,20	Preñada	Sin Aislamiento
11	424	7-sep.-18	200	4	OZONO	10	1,54	2	1,26	Preñada	Sin Aislamiento
12	530	17-oct.-18	200	4	OZONO	8	2,52	2	1,31	Preñada	Staphylococcus spp.
13	555	15-sep.-18	188	3	OZONO	8	2,88	4	1,91	Vacia	Sin Aislamiento
14	576	2-oct.-18	171	3	OZONO	13	1,66	4	1,31	Preñada	Staphylococcus spp.

**Hacienda Nero**

N.	N. ARETE	Parto	Días Abiertos	Numero Servicios	TX	PMN Iniciales	Diámetro luz uterina Inicial	PMN Finales	Diam Post Final	PREÑEZ	Agentes Bacterianos
1	396	1-sep.-17	300	4	Metricure	5	2,96	3	1,63	Preñada	Sin Aislamiento
2	380	8-ene.-18	411	3	Metricure	6	3,23	1	1,81	Vacia	Bacillus spp.
3	336	10-jun.-17	401	4	Metricure	15	1,94	10	2,34	Vacia	Echericha Coli
4	418	4-dic.-18	152	3	Metricure	16	3,90	12	1,81	Vacia	Staphylococcus spp.
5	374	16-sep.-18	160	3	Metricure	18	1,81	5	1,96	Preñada	Staphylococcus spp.
6	382	4-jul.-18	234	4	Metricure	17	2,19	10	1,44	Vacia	Staphylococcus spp.
7	459	20-oct.-18	154	3	Metricure	18	1,98	14	1,30	Vacia	Staphylococcus spp.
8	320	28-abr.-18	301	3	OZONO	21	2,42	4	1,81	Vacia	Echericha Coli
9	442	4-oct.-18	400	5	OZONO	16	1,60	5	1,80	Preñada	Staphylococcus spp.
10	465	2-ago.-18	205	3	OZONO	11	3,40	4	3,40	Vacia	Sin Aislamiento
11	309	7-mar.-18	353	3	OZONO	12	3,06	7	1,89	Preñada	Staphylococcus spp.
12	466	25-oct.-18	355	3	OZONO	13	2,02	4	2,34	Vacia	Staphylococcus spp. Bacillus spp.
13	472	11-sep.-18	165	3	OZONO	6	0,92	3	0,90	Vacia	Sin Aislamiento
14	386	20-dic.-16	395	5	OZONO	23	2,01	4	2,00	Preñada	Pseudomonas spp. Staphylococcus spp.



DEJAMOS CONSTANCIA DE HABER RECIBIDO LA TESIS DE GRADO DEL EGRESADO

BRYAN ROMERO AGUILAR

MISMA QUE HA SIDO REVISADA Y CORREGIDA PARA CONTINUAR CON LOS TRÁMITES DE GRADUACIÓN.

Cuenca, 12 de noviembre de 2019



Dr. Manuel Soria

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Dr. Luis Galarza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Dr. Rafael Ochoa

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Dr. Johnny Narváez

DIRECTOR DE TESIS